

Université de Montréal

**Découverte d'un gène causant une ataxie spastique
héréditaire dominante dans la population de Terre-
Neuve**

par

Cynthia Bourassa

Département de physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise

en Sciences neurologiques

Avril, 2012

© Cynthia Bourassa, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Découverte d'un gène causant une ataxie spastique héréditaire dominante dans la
population de Terre-Neuve

Présenté par :

Cynthia Bourassa

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Richard Robitaille, président-rapporteur

Guy A. Rouleau, directeur de recherche

John D. Rioux, membre du jury

Résumé

Les ataxies spastiques héréditaires forment une famille hétérogène de désordres qui ont des points communs avec les ataxies héréditaires et les paraplégies spastiques héréditaires. Un de ces éléments est une ataxie, soit une difficulté de coordination des membres souvent due à un dommage au cervelet. L'autre est une spasticité des membres inférieurs, souvent due à des dommages à la voie cortico-spinale. Une seule ataxie spastique à hérédité autosomique dominante a été rapportée dans la littérature, et il s'agit de SPAX1. À l'aide de trois familles de Terre-Neuve présentant ce phénotype, le locus a été identifié en 2002. Dans ce mémoire, c'est de la découverte du gène causal dont il est question. La mutation a été trouvée dans le gène *VAMPI*, qui encode la protéine synaptobrevine 1, une protéine synaptique impliquée dans l'exocytose des neurotransmetteurs. Il est aussi question de la caractérisation fonctionnelle de la mutation sur l'ARN et des conséquences possibles sur la protéine, concordant avec les symptômes de la maladie.

Mots-clés : ataxie, paraplégie spastique, génétique, effet fondateur, hérédité dominante, *VAMPI*, épissage

Abstract

Hereditary spastic ataxias comprise a family of heterogeneous disorders resembling both hereditary ataxias and hereditary spastic paraplegias. The similar symptoms are ataxia, which is a problem with limb coordination due to cerebellar damage, and lower-limb spasticity due to corticospinal tract degeneration. Only one spastic ataxia inherited in an autosomal dominant fashion has been reported in the literature: SPAX1. The locus was identified in 2002 using three families from Newfoundland with the specific phenotype. This thesis reports the discovery of the causative mutation in the *VAMP1* gene, which encodes VAMP1/synaptobrevin 1, a synaptic protein involved in neurotransmitter exocytosis. Experiments characterizing the effect of the mutation on RNA were conducted, leading to a possible molecular explanation of the symptoms.

Keywords: ataxia, spastic paraplegia, genetics, founder effect, dominant inheritance, *VAMP1*, splicing

Table des matières

Préambule.....	1
Introduction.....	2
Les ataxies héréditaires.....	2
Les paraplégies spastiques héréditaires.....	7
Les ataxies spastiques héréditaires.....	10
Effet fondateur dans la province de Terre-Neuve et Labrador.....	14
Exocytose et protéines vésiculaires.....	15
Objectifs de recherche.....	16
Chapitre 1 : Étude de liaison génétique.....	18
Familles et phénotype.....	18
Études génétiques.....	19
Chapitre 2 : Article.....	25
<i>VAMPI</i> Mutation Causes chromosome 12p13 Hereditary Spastic Ataxia in Newfoundland Families.....	26
Abstract.....	27
Report.....	27
Supplementary information.....	43
Acknowledgments.....	44
Web Resources.....	44
References.....	44

Discussion	45
Rappel clinique	45
La grande famille des synaptobrévines	47
VAMP1 dans le système nerveux	49
Similitudes génétiques avec d'autres ataxies ou paraplégies.....	52
Expériences complémentaires suggérées	54
Conclusion	55

Liste des tableaux

Tableau I : Les ataxies héréditaires dominantes, du génome à la protéine

Tableau II : Les ataxies héréditaires récessives, du génome à la protéine

Tableau III : Les paraplégies spastiques héréditaires, du génome à la protéine

Tableau IV : Résumé des fonctions altérées dans les ataxies héréditaires et les paraplégies héréditaires

Tableau V : Résultats génétiques du séquençage des familles et des proposants

Tableau S1. Amorces utilisées pour amplifier *VAMP1*

Tableau S2. Amorces et conditions utilisées pour créer l'insert du minigène

Liste des figures

Figure 1 : Pédigrée de la famille 13

Figure 2 : Pédigrée de la famille 71

Figure 3 : Pédigrée de la famille 27

Figure 4 : Pédigrée de la famille FSPAT6

Figure 5 : *VAMPI*, du gène à la protéine

Figure 6 : Expériences d'épissage de l'ARN extraite des cellules COS7 transfectées

Figure S1 : Carte géographique de Terre-Neuve

Liste des sigles et abréviations

ABL : abetalipoprotéinémie

AD : autosomique dominant

ADCA : ataxies cérébelleuses autosomiques dominantes

ADN : acide désoxyribonucléique

AOA1 : ataxie avec apraxie oculomotrice type 1

AOA2 : ataxie avec apraxie oculomotrice type 2

AR : autosomique récessif

ARN : acide ribonucléique

ARSAL : ataxie spastique autosomique récessive avec leucoencéphalopathie

AT : ataxie avec télangiectasie

ATLD : ataxia telangiectasia-like disorder

Ca²⁺ : ion calcique

CEPH : Centre d'Étude du Polymorphisme Humain

CTX : xanthomatose cérébro-tendineuse

DRPLA : atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne

EA : ataxies épisodiques

HSP : paraplégie spastique héréditaire

IOSCA : ataxie spinocérébelleuse infantile

MJD : maladie de Machado-Joseph

MSS : syndrome de Marinesco-Sjögren

PHARC : polyneuropathy, hearing loss, ataxia, retinitis pigmentosa, cataract

SACS : spastic ataxia Charlevoix-Saguenay like

SANDO : ataxie sensorielle avec neuropathie, dysarthrie et ophtalmoparésie

SCA : ataxies spinocérébelleuses

SCAE : ataxie spinocérébelleuse avec épilepsie

SCAN1 : ataxie spinocérébelleuse avec neuropathie axonale

SCAR8 : ataxie spinocérébelleuse autosomique récessive 8

SCAR10 : ataxie spinocérébelleuse autosomique récessive 10

SNAP-25 : synaptosomal-associated protein, 25-KD

SNAREs : soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors

SPG : gène de paraplégie spastique

SPAX1 : ataxie spastique 1, autosomique dominante

SPAX2 : ataxie spastique 2, autosomique récessive

SPAX3 : ataxie spastique 3, autosomique récessive

SPAX4 : ataxie spastique 4, autosomique récessive

UTR : région non transcrite, en 5' et en 3' du gène

VAMP : vesicle-associated membrane protein

VAMP1 : synaptobrévine 1 ou vesicle-associated membrane protein 1

VED : déficience familiale isolée en vitamine E

*À tous ceux que j'aime : parents, amis,
amoureux, merci de votre soutien et de vos
encouragements ; ils m'ont été très chers.*

Remerciements

Tout d'abord, un grand merci aux familles qui ont accepté de participer à l'étude, ainsi qu'aux volontaires qui ont servi de contrôles populationnels. Dans la même optique, un merci spécial aux Dr Roger Green, Dre Kanwal K. Richardson et Dr Mark G. Stefanelli.

Ensuite, je voudrais remercier les Instituts de recherche en santé du Canada pour le financement de ma dernière année de maîtrise via l'octroi d'une Bourse d'études supérieures du Canada Frederick Banting et Charles Best. Je souhaiterais aussi remercier le Département de physiologie de l'Université de Montréal et la Faculté des études supérieures pour la Bourse de recrutement que j'ai obtenue, finançant ma première année. De plus, je voudrais remercier la Direction du Centre de recherche du CHUM pour m'avoir donné une Bourse complémentaire et m'avoir décerné un Prix pour la meilleure présentation par affiche, catégorie maîtrise, lors du 13^e congrès annuel des étudiants, stagiaires et résidents du Centre de recherche du CHUM.

Je voudrais avoir aussi un merci tout spécial pour le Dr Patrick A. Dion, puisque son aide précieuse et son soutien m'ont été apportés tout au long de mon séjour dans le laboratoire du Dr Rouleau. Merci aussi à Daniel Rochefort et Pascale Hince pour leur soutien technique et leurs idées. J'aimerais remercier également la Dre Inge A. Meijer pour

sa supervision lorsque j'étais stagiaire et pour m'avoir aiguillée sur la suite de son projet, qui deviendrait le mien.

Enfin, un immense merci au Dr Guy A. Rouleau pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, d'abord comme stagiaire, et pour avoir cru en mes capacités d'étudiante diplômée, en acceptant de me confier ce projet.

Préambule

Il existe plusieurs maladies auxquelles on réfère comme mendéliennes, c'est-à-dire pour lesquelles un seul variant génétique est responsable du phénotype. Pour plusieurs de ces maladies, la génétique a résolu le mystère et le variant responsable a été identifié. En contrepartie, il reste plusieurs maladies rares pour lesquelles la cause n'a pas été identifiée, comme l'ataxie spastique héréditaire dominante (SPAX1). Cette pathologie ressemble aux ataxies héréditaires, mais avec une composante de paraplégies spastiques héréditaires. Seuls quelques familles et cas isolés (proposants) ont été identifiés comme atteints par SPAX1, et tous ont des origines dans la province de Terre-Neuve – et – Labrador. La particularité de cette population est son effet fondateur, phénomène génétique contribuant à l'éclosion de maladies mendéliennes rares.

Au niveau génétique, l'emplacement chromosomique (locus) lié à la maladie avait déjà été publié en 2002. À cette époque, la suite logique de l'expérience était de séquencer des gènes candidats. Le présent mémoire révèle la mutation causant SPAX1, qui a été trouvée par séquençage de type Sanger. Le gène impliqué est *VAMPI* et sa protéine la synaptobrevine 1. La synaptobrevine fait partie de la famille des protéines vésiculaires, nécessaires lors de l'exocytose des neurotransmetteurs.

Cette étude est intéressante pour les membres des familles atteints de SPAX1, pour qui l'énigme de leur problème neurologique est résolue.

Introduction

Les ataxies héréditaires

Depuis les 30 dernières années, d'immenses progrès ont été réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire, particulièrement avec le premier séquençage du génome humain en 2001 (Lander et al. 2001; Venter et al. 2001). Dès lors, il a été possible d'identifier des causes moléculaires et/ou génétiques à des pathologies rares, comme les ataxies héréditaires et les paraplégies spastiques héréditaires (HSP). Ces deux maladies neurodégénératives restent à ce jour encore incurables. L'objectif des recherches en biologie moléculaire est, d'une part, de comprendre les interactions entre protéines dans les voies métaboliques et les conséquences qu'une protéine dysfonctionnelle peut avoir sur sa voie métabolique ; d'autre part, de chercher des stratégies thérapeutiques adaptées à la maladie.

Les ataxies héréditaires sont un groupe de maladies rares, ayant une prévalence estimée à 6,5/100 000 en Norvège (Erichsen et al. 2009). Ce groupe comprend plusieurs sous-catégories, notamment les ataxies spinocérébelleuses (SCA) appelées aussi ataxies cérébelleuses autosomiques dominantes (ADCA), qui ont une prévalence entre 1 et

5/100 000 (Durr 2010; Erichsen et al. 2009; Teive 2009). La forme la plus commune est SCA3, appelée aussi la maladie de Machado-Joseph (MJD) (Durr 2010; Teive 2009). Parmi les autres ataxies héréditaires, il y a les ataxies épisodiques, les ataxies récessives, l'atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne (DRPLA) et plusieurs formes d'ataxies complexes (Bird 1993; Klockgether 2011). Dans tous les cas, les personnes atteintes ont des difficultés de coordination des mouvements, des problèmes de posture et souvent des difficultés de coordination des membres, de la parole et un nystagmus. Une ou plusieurs des causes suivantes sont observées chez les patients : une dégénérescence du cervelet, une lésion de la moelle épinière ou une perte de sensibilité dans les nerfs périphériques. Dans les formes dominantes, l'âge d'apparition de la maladie varie entre 30 et 50 ans, mais un phénomène d'anticipation est observable, ce qui sera décrit un peu plus loin (Teive 2009).

Les ataxies héréditaires sont classifiées selon leur mode de transmission (Tableau I page 5 et Tableau II page 6). Dans les ataxies autosomiques dominantes, il y a 29 SCA, 6 ataxies épisodiques, DRPLA, ainsi que 4 autres formes complexes (Bird 1993). Il existe une explication génétique pour 26 de ces maladies. Au niveau des ataxies autosomiques récessives, 27 ont été répertoriées dont l'ataxie de Friedreich qui est la forme d'ataxie héréditaire la plus fréquente (Klockgether 2011). Elles ont toutes une composante complexe et seulement 17 ont été élucidées par la génétique. Il existe aussi cinq ataxies héréditaires liées au chromosome X et trois ataxies liées à des désordres mitochondriaux héréditaires.

Lorsqu'on parle de forme « complexe », cela implique d'autres symptômes tels la démence, des neuropathies sensorielles, un retard mental, de l'épilepsie, etc. (Durr 2010)

Au niveau moléculaire (Tableau IV page 13), les gènes mutés dans les ataxies dominantes sont impliqués dans quelques mécanismes cellulaires, notamment : (1) la transcription et l'ARN, (2) l'homéostasie du calcium et du potassium, (3) la neurotransmission glutamatergique, (4) la fonction mitochondriale, (5) l'accumulation d'agrégats (Durr 2010). Quant aux gènes responsables des ataxies récessives, ils se regroupent en trois catégories protéiques fonctionnelles : (1) les protéines mitochondriales ou associées au stress oxydatif, (2) les protéines de réparation d'ADN, (3) autres mécanismes (Klockgether 2011). Dans beaucoup d'ataxies spinocérébelleuses, les mutations consistent en une expansion de polyglutamines, c'est-à-dire qu'une séquence répétée de glutamines sera anormalement longue. Il existe un seuil du nombre de répétitions au-delà duquel la maladie se déclare, et ce seuil est propre à chacune. En général, plus la séquence est longue, plus l'âge d'apparition de la maladie est tôt, mais cette relation n'est pas linéaire. On remarque aussi qu'une transmission parentale peut entraîner une séquence de polyglutamines est plus longue. C'est ce qu'on appelle le phénomène d'anticipation (Durr 2010).

Tableau I : Les ataxies héréditaires dominantes, du génome à la protéine

<i>Ataxie</i>	<i>Locus</i>	<i>Gène</i>	<i>Protéine/Famille</i>	<i>Prévalence</i>	<i>Référence</i>
SCA1	6p22.3	<i>ATXN1</i>	Ataxin1	6% ¹	(Banfi et al. 1994)
SCA2	12q24.13	<i>ATXN2</i>	Ataxin2	13% ¹	(Pulst et al. 1996)
MJD (SCA3)	14q32.12	<i>ATXN3</i>	Ataxin3	23%¹, donc < 1/100 000*	(Kawaguchi et al. 1994)
SCA5	11q13.2	<i>SPTBN2</i>	Beta-III spectrin	3 familles	(Ikeda et al. 2006)
SCA6	19p13.2	<i>CACNA1A</i>	Canal calcique	12% ²	(Zhuchenko et al. 1997)
SCA7	3p14.1	<i>ATXN7</i>	Ataxin7	3% ³	(Trottier et al. 1995)
SCA8	13q21	<i>ATXN8</i> et <i>ATXN8OS</i>	Ataxin8	3%	(Koob et al. 1999)
SCA10	22q13.31	<i>ATXN10</i>	Ataxin10	15% au Mexique	(Matsuura et al. 2000)
SCA11	15q15.2	<i>TTBK2</i>	Tau tubulin kinase 2	3 familles	(Houlden et al. 2007)
SCA12	5q32	<i>PPP2R2B</i>	Protein Phosphatase 2	20% en Inde ⁴	(Holmes et al. 1999)
SCA13	19q13.33	<i>KCNC3</i>	Canal potassique	2 familles	(Waters et al. 2006)
SCA14	19q13.42	<i>PRKCG</i>	PKC γ	1,5% ⁵	(Chen et al. 2003)
SCA15/SCA16	3p26.1	<i>ITPR1</i>	ITP receptor 1	8,9% en Allemagne ⁶	(van de Leemput et al. 2007)
SCA17	6q27	<i>TBP</i>	TATA binding protein	0,3% en Corée ⁷	(Koide et al. 1999)
SCA18	7q31.1	<i>IFRD1</i>	Régulateur de l'interféron	1 famille	(Brkanac et al. 2009)
SCA20	11q12.2-12.3	duplication	? DAGLA	1 famille	(Knight et al. 2008)
SCA23	20p13	<i>PDYN</i>	Prodynorphin	0,5% au Pays-Bas	(Bakalkin et al. 2010)
SCA27	13q33.1	<i>FGF14</i>	Fibroblast Growth Factor 14	1 famille et 1 proposant	(van Swieten et al. 2003)
SCA28	18p11.21	<i>AFG3L2</i>	ATPase family gene 3-like 2	2,6% ⁸	(Di Bella et al. 2010)
SCA31	16q21	<i>BEAN</i>	Brain expressed associated with NEDD4	9% au Japon ⁹	(Ishikawa et al. 2005)
SCA36	20p13	<i>NOP56</i>	NOP56	5 familles au Japon	(Kobayashi et al. 2011)
DRPLA	12p13.31	<i>ATNI</i>	Atrophia1	2,5% au Japon ¹⁰	(Koide et al. 1994)
EA1	12p13.32	<i>KCNA1</i>	Canal potassique	} Moins de 1/100 000 pour toutes les ataxies épisodiques réunies ¹¹	(Browne et al. 1994)
EA2	19p13.2	<i>CACNA1A</i>	Canal calcique		(Jodice et al. 1997)
EA5	2q23.3	<i>CACNB4</i>	Canal calcique		(Escayg et al. 2000)
EA6	5p13.2	<i>SLC1A3</i>	Transporteur de glutamate		(Jen et al. 2005)

Les prévalences représentent en quelle proportion d'ataxies dominantes se retrouve l'ataxie spécifique, dans une population donnée. ¹(Geschwind et al. 1997a) ²(Geschwind et al. 1997b) ³(Storey et al. 2000) ⁴(Fujigasaki et al. 2001) ⁵(Klebe et al. 2005) ⁶(Synofzik et al. 2011) ⁷(Lee et al. 2009) ⁸(Cagnoli et al. 2010) ⁹(Basri et al. 2007) ¹⁰(Hirayama et al. 1994) ¹¹(Jen et al. 2007) *Calcul à des fins comparatives avec l'ataxie de Freidreich présentée dans le tableau suivant Note : Seules les ataxies avec les gènes causaux identifiés sont listées dans ce tableau, à des fins de concision. La référence indiquée est celle du premier groupe ayant trouvé des mutations causales.

Tableau II : Les ataxies héréditaires récessives, du génome à la protéine

<i>Ataxie</i>	<i>Locus</i>	<i>Gène</i>	<i>Protéine/Famille</i>	<i>Prévalence</i>	<i>Référence</i>
FRDA	9q21.11	<i>FXN</i>	Frataxin	2-4/100 000¹	(Campuzano et al. 1996)
AT	11q22.3	<i>ATM</i>	ATM	1-2,5/100 000 ¹	(Savitsky et al. 1995)
ATLD	11q21	<i>MRE11A</i>	Meiotic recombinaison 11	6% d'AT	(Stewart et al. 1999)
VED (associée avec une ataxie)	8q12.3	<i>TTPA</i>	Tocopherol transport protein α	Rare	(Ouahchi et al. 1995)
ABL (associée avec une ataxie)	4q23	<i>MTP</i>	Microsomal triglyceride transfer protein	Rare	(Shoulders et al. 1993)
AOA1	9p21.1	<i>APTX</i>	Aprataxin	21% au Portugal ²	(Date et al. 2001)
AOA2 ^a	9q34.13	<i>SETX</i>	Senataxin	8% non-FRDA ³	(Moreira et al. 2004)
IOSCA ^b	10q24.31	<i>C10orf2</i>	Twinkle	15 familles finlandaises	(Nikali et al. 2005)
MSS	5q31.2	<i>SIL1</i>	SIL1	Rare	(Anttonen et al. 2005)
Maladie de Refsum	10p13	<i>PHYH</i>	Phytanoyl-CoA hydroxylase	Rare	(Braverman et al. 2002; Jansen et al. 1997; Mihalik et al. 1997)
	6q23.3	<i>PEX7</i>	Peroxisome biogenesis factor		
PHARC	20p11.21	<i>ABHD12</i>	Hydrolase	9 familles	(Fiskerstrand et al. 2010)
Déficiences en CoQ ₁₀	4q21.23	<i>COQ2</i>	Apraxin	2 familles	(Quinzii et al. 2005)
SCA9 ^c aussi pour ce gène	1q42.13	<i>CABC1</i>	Chaperone-activity of BC1	3 familles	(Mollet et al. 2007)
		<i>et autres</i>		4 familles « autres »	
CTX	2q35	<i>CYP27A1</i>	Sterol-27 hydroxylase	2/100 000 ¹	(Cali et al. 1991)
SCAR8 ^d	6q25.1-25.2	<i>SYNE1</i>	Protéine d'enveloppe nucléaire	Rare	(Gros-Louis et al. 2007)
SANDO, SCAE	15q26.1	<i>POLG</i>	Polymerase gamma	Rare	(Van Goethem et al. 2004)
SCAN1	14q32.1	<i>TDP1</i>	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase-1	Rare	(Takashima et al. 2002)
SCAR10	3p22.1	<i>ANO10</i>	Anoctamin 10	3 familles	(Vermeer et al. 2010)

Les prévalences sont estimées pour une population donnée. ¹(Bird 1993; Palau and Espinos 2006) ²(Barbot et al. 2001) ³(Le Ber et al. 2004)

^a aussi connue comme ataxie spinocérébelleuse autosomique récessive 1 (SCAR1) ^b aussi connue comme syndrome de déplétion d'ADN mitochondrial (MTDPS7)

^c aussi connue comme ataxie cérébelleuse autosomique récessive type 2 (ARCA2) ^d aussi connue comme ataxie de Beauce (ARCA1)

Note : Seules les ataxies avec les gènes causaux identifiés sont listées dans ce tableau, à des fins de concision. La référence indiquée est celle du premier groupe ayant trouvé des mutations causales.

Les paraplégies spastiques héréditaires

Les paraplégies spastiques héréditaires (HSP) ont une prévalence légèrement supérieure aux ataxies héréditaires dans la population norvégienne, soit 7,4/100 000 (Erichsen et al. 2009), mais l'estimé mondial varie entre 3 et 10/100 000 (Dion et al. 2009; Rosulescu et al. 2009). La prévalence des HSP à hérédité autosomique dominante varie entre 1 et 5,5/100 000, selon quelle population est observée (Erichsen et al. 2009; McMonagle et al. 2002). On retrouve des HSP dites « pures », où les patients présentent les symptômes suivants : une faiblesse et une spasticité des extrémités inférieures, des problèmes à la vessie et une diminution de la sensibilité aux vibrations. Par contre, il existe aussi des HSP « complexes », dans lesquelles différents symptômes peuvent s'ajouter, tels des convulsions, des troubles cognitifs et une atrophie musculaire (Fink 1993). Les neurones impliqués dans les HSP sont les motoneurones supérieurs, qui descendent des centres supérieurs vers la moelle épinière (Dion et al. 2009). Les motoneurones supérieurs forment la voie cortico-spinale et ce sont les neurones possédant les plus longs axones dans cette voie qui sont le plus souvent touchés par une dégénérescence dans les HSP (Blackstone et al. 2011).

On répertorie 43 loci « SPG », pour « spastic paraplegia », dont 22 ont été élucidés par la génétique (Tableau III page 9). En suivant la même classification que les ataxies héréditaires, on en dénombre 17 à hérédité autosomique dominante, 21 à hérédité

autosomique récessive et 5 liées au chromosome X (Blackstone et al. 2011; Dion et al. 2009). C'est SPG4 qui constitue la forme la plus courante d'HSP « pure » à hérédité autosomique dominante (Durr et al. 1993). Si on classifie les HSP selon qu'elles soient « pures » ou « complexes », on peut dénombrer 21 HSP « pures » ou « pures et complexes », alors que 18 sont « complexes » et 1 est inconnu (Dion et al. 2009). Généralement, les HSP pures sont à hérédité autosomique dominante (Rosulescu et al. 2009).

Tableau III : Les paraplégies spastiques héréditaires, du génome à la protéine

<i>HSP</i>	<i>Hérédité</i>	<i>Locus</i>	<i>Gène</i>	<i>Protéine/Famille</i>	<i>Prévalence</i>	<i>Référence</i>
SPG1 ^a	Lié à X	Xq28	<i>LICAM</i>	L1 cell adhesion molecule	>100 familles ¹	(Jouet et al. 1994)
SPG2	Lié à X	Xq22.2	<i>PLP1</i>	Myelin proteolipid protein	> 75 familles ¹	(Saugier-Weber et al. 1994)
SPG3A	AD	14q22.1	<i>ATL1</i>	Atlastin-1	11% HSP-AD en Norvège ²	(Zhao et al. 2001)
SPG4	AD	2p22.3	<i>SPAST</i>	Spastin	15-40%, selon l'origine ethnique³	(Hazan et al. 1999)
SPG5A	AR	8q12.3	<i>CYP7B1</i>	Cytochrome P450	9 familles	(Tsaousidou et al. 2008)
SPG6	AD	15q11.2	<i>NIPA1</i>	Non-imprinted in Prader-Willi / Angelman syndrome region protein 1	2 familles	(Rainier et al. 2003)
SPG7	AR	16q24.3	<i>SPG7</i>	Paraplegin	<5% HSP-AR ⁴	(Casari et al. 1998)
SPG8	AD	8q24.13	<i>KIAA0196</i>	Strumpellin	3 familles	(Valdmanis et al. 2007)
SPG10	AD	12q13	<i>KIF5A</i>	Kinésine	3 familles	(Reid et al. 2002)
SPG11	AR	15q21.1	<i>SPG11</i>	Spatascin	20% HSP-AR en Norvège ² et en Tunisie ⁵	(Stevanin et al. 2007)
SPG13	AD	2q33.1	<i>HSPD1</i>	Heat shock protein 60	1 famille	(Hansen et al. 2002)
SPG15	AR	14q24.1	<i>ZFYVE26</i>	Spastizin	4% ⁶ -10% ⁵	(Hanein et al. 2008)
SPG17	AD	11q12.3	<i>BSCL2</i>	Seipin	2 familles	(Windpassinger et al. 2004)
SPG20	AR	13q13.3	<i>SPG20</i>	Spartin	3 familles	(Patel et al. 2002)
SPG21 ^b	AR	15q21.1	<i>SPG21</i>	Maspardin	1 famille	(Simpson et al. 2003)
SPG22 ^c	Lié à X	X13.2	<i>SLC16A2</i>	Transporteur d'acide monocarboxylique	4 familles	(Dumitrescu et al. 2004)
SPG31	AD	2p11.2	<i>REEP1</i>	Receptor expression-enhancing protein 1	4% HSP-AD en Norvège ²	(Zuchner et al. 2006)
SPG33	AD	10q24.2	<i>ZFYVE27</i>	Protrudin	1 famille	(Mannan et al. 2006)
SPG35	AR	16q23.1	<i>FA2H</i>	Fatty acid 2-hydroxylase	5 familles	(Edvardson et al. 2008)
SPG39	AR	19p13.2	<i>PNPLA6</i>	Neuropathy target esterase	2 familles	(Rainier et al. 2008)
SPG42	AD	3q25.31	<i>SLC33A1</i>	Transporteur d'acetyl-CoA	1 famille	(Lin et al. 2008)
SPG44	AR	1q42.13	<i>GJC2</i>	Connexin 47	1 famille	(Orthmann-Murphy et al. 2009)
SPG48	AR	7p22.1	<i>KIAA0415</i>	KIAA0415	1 famille	(Slabicki et al. 2010)

Les prévalences représentent en quelle proportion de paraplégies spastiques héréditaires se retrouve la maladie spécifique, dans une population donnée. ¹(Tallaksen et al. 2001) ²(Erichsen et al. 2009) ³(Shoukier et al. 2009) ⁴(Elleuch et al. 2006) ⁵(Boukhris et al. 2009) ⁶(Goizet et al. 2009)

^aconnu aussi comme le syndrome de MASA ^bconnu aussi comme le syndrome de MAST ^cconnu comme le syndrome Allan-Herndon-Dudley

Note : Seules les paraplégies spastiques avec les gènes causaux identifiés sont listées dans ce tableau, à des fins de concision. La référence indiquée est celle du premier groupe ayant trouvé des mutations causales.

Pour ce qui est des gènes causant les paraplégies spastiques (Tableau IV page 13), ils sont regroupés sous différentes catégories, entre autres : (1) le trafic membranaire et le transport axonal, (2) les protéines mitochondriales, (3) la myélinisation, (4) les autres fonctions. Dans cette dernière catégorie, on retrouve notamment des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides (Blackstone et al. 2011; Dion et al. 2009). On ne retrouve pas de classe de gènes plus particulièrement impliqués dans les HSP pures ou complexes, pas plus que dans les HSP autosomique dominantes ou autosomique récessives.

Bien qu'elles semblent très différentes a priori, les ataxies héréditaires et les paraplégies héréditaires sont deux classes de pathologies neurodégénératives souvent difficiles à distinguer en clinique. Par exemple, il serait possible qu'une personne ayant une HSP « pure » commence à développer des signes d'atteinte cérébelleuse qui soient indissociables d'un patient ataxique. De plus, il est fréquent de voir des signes d'ataxie chez les patients atteints de paraplégie spastique « complexe ». D'un autre côté, dans plusieurs maladies neurodégénératives, comme l'ataxie, la faiblesse et la spasticité des membres imitent les symptômes d'une HSP (Hedera 2009).

Les ataxies spastiques héréditaires

Bien que l'on retrouve des symptômes de spasticité chez les ataxiques et qu'il peut y avoir de l'ataxie chez les personnes atteintes de paraplégie spastique, il existe aussi ce qui

tend à être une classe séparée de désordres : les ataxies spastiques héréditaires. La première identifiée est l'ataxie spastique autosomique récessive de Charlevoix-Saguenay (SACS) [MIM #270550], connue précédemment comme ARSACS. Les symptômes sont : une ataxie spastique de posture, une diminution de la conduction nerveuse sensitive et de la rapidité des motoneurones, une dégénération axonale des voies cortico-spinale et spinocérébelleuse, une atrophie du vermis ; et des autopsies ont montré une absence de cellules de Purkinje (J. P. Bouchard et al. 1978; R. W. Bouchard et al. 1979b; J. P. Bouchard et al. 1979a; J. P. Bouchard et al. 1998). En utilisant des familles Canadienne-françaises, une équipe ont révélé le locus 13q12 comme étant lié à cette maladie (Engert et al. 1999; Richter et al. 1999). Ensuite, une ataxie spastique à hérédité autosomique dominante a été découverte (Grewal et al. 2004; Meijer et al. 2002). Il s'agit de SPAX1 [MIM #108600], qui fera l'objet de ce mémoire.

Subséquemment, trois autres ataxies spastiques, toutes à hérédité autosomique récessive, ont été identifiées. SPAX2 [MIM #611302] comporte des symptômes d'ataxies cérébelleuses, des signes pyramidaux, de la spasticité et des problèmes de postures qui apparaissent plus tardivement. Le locus sur le chromosome 17p13 a été trouvé à l'aide d'une famille marocaine consanguine (Bousslam et al. 2007). SPAX3 [MIM #611390], connue aussi sous le nom d'ARSAL, est due à une atrophie cérébelleuse et plus de la moitié des cas présente une dégénérescence de la matière blanche. Les symptômes clés sont d'avantage de l'ordre de l'ataxie, quoique la dysarthrie, la rigidité des membres et d'autres

signes typiques des paraplégies spastiques sont présents. Elle serait due à une mutation fondatrice issue de la région de Portneuf au Québec et le locus sur trouve sur le chromosome 2q33-34 (Thiffault et al. 2006). En 2010, une quatrième ataxie spastique a été rapportée, SPAX4 [MIM #613672], où l'on retrouve des signes d'ataxie, de paraparésie, de dysarthrie et une atrophie optique. C'est une famille Amish qui a été décrite ayant cette maladie, pour laquelle le locus est sur le chromosome 10p11.23 (Crosby et al. 2010).

Sur les quatre ataxies spastiques récessives identifiées, seulement deux ont été expliquées par une mutation génétique (Tableau IV page 13). Dans le cas de SACS, l'utilisation des familles Canadienne-françaises a permis d'identifier le gène *SACS* [MIM #604490] comme causant la maladie (Engert et al. 2000). La protéine saccine est une co-chaperone de Hsp70 (Parfitt et al. 2009), qui lorsque mutée, serait incapable d'hydrolyser de l'ATP (Anderson et al. 2010). Pour SPAX4, il s'agit de la polymérase poly(A) mitochondriale (*MTPAP*) [MIM #613669] qui est mutée (Crosby et al. 2010). Cette protéine sert à ajouter la queue poly(A) en 3' des ARN mitochondriaux (Tomecki et al. 2004). Pour SPAX2 et SPAX3, des gènes candidats ont été séquencés, sans qu'aucune mutation n'ait été trouvée lors de la publication du locus (Bousslam et al. 2007; Thiffault et al. 2006).

Tableau IV : Résumé des fonctions altérées dans les ataxies héréditaires et les paraplégies héréditaires

<i>Fonction</i>	<i>Ataxie dominante</i>	<i>Ataxie récessive</i>	<i>Paraplégie spastique</i>	<i>Ataxie spastique</i>
Transcription et ARN	✓			✓
Homéostasie du calcium et du potassium	✓			
Neurotransmission glutamatergique	✓			
Protéines mitochondriales	✓	✓	✓	
Accumulation d'agrégats	✓			✓
Stress oxydatif		✓		
Réparation d'ADN		✓		
Métabolisme des lipides		✓	✓	
Trafic membranaire et transport axonal	✓		✓	
Myélinisation			✓	
Autres		✓	✓	

Effet fondateur dans la province de Terre-Neuve et Labrador

Les dernières statistiques montrent que la population estimée de la province de Terre-Neuve et Labrador totalise 510 578 personnes (Statistique-Canada 2011). La population Terre-neuvienne est issue de quelques milliers de colons venus s'y établir autour du 17^e siècle. En 1675, il y avait près de 30 villages portuaires autour de la péninsule d'Avalon, qui se composaient de deux à cinq familles chacun (Pope et al. 2011). En 1760, on dénombrait environ 20 000 habitants dans la province, tous issus de trois grandes migrations : française, irlandaise et britannique. La majorité de la population de la province est d'origine britannique, alors que la descendance irlandaise est moins représentée et celle française l'est très peu (Rahman et al. 2003).

La population actuelle est à environ 20 générations de ses fondateurs, donc c'est une population relativement jeune. Comme les mariages n'avaient lieu qu'entre des individus de la même origine, langue et religion, et que les villages étaient petits et isolés, il existerait une grande homogénéité allélique dans les sous-groupes de population. C'est ce qu'on appelle un effet fondateur. Cette caractéristique en fait une population de choix pour l'étude de maladies monogéniques rares, qui sont d'ailleurs jusqu'à 10 fois plus prévalentes dans la population de Terre-Neuve que chez les Européens ou les Américains. Cela est explicable par une dérive génétique, ce qui veut dire que les allèles porteurs de mutations sont

surreprésentés dans cette population par rapport aux autres Caucasiens (Rahman et al. 2003).

Récemment, des études d'ADN mitochondrial ont montré que la population de Terre-Neuve et Labrador, prise ensemble, n'est pas si homogène que prévu. Par contre, il existe des effets fondateurs « locaux », où la population se ressemble plus qu'ailleurs (Pope et al. 2011). En effet, en 2001, on estimait que 60% de la population vivait dans des villages de moins de 2500 habitants. Au niveau de la péninsule d'Avalon, la taille des villages variait entre 1000 et 5000 habitants, pour les villages de plus de 1000 habitants. C'est dans ce genre de région qu'on peut retrouver un effet fondateur « local » (Rahman et al. 2003).

Exocytose et protéines vésiculaires

Pour qu'il y ait exocytose, quatre groupes de protéines sont nécessaires : les protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors), dont les synaptobrévines, les syntaxines et SNAP-25 (synaptosomal-associated protein, 25-KD), les protéines SM, telles Munc18, ainsi que les protéines Rab et les effecteurs, qui servent davantage à la vérification de l'exocytose (Suudhof 2008). Les protéines SNARE servent à l'ancrage de la vésicule synaptique. Une interaction entre la synaptobrévine (protéine vésiculaire) et les deux autres SNAREs est à l'origine de cet arrimage. Les

protéines SM sont tout aussi importantes pour la fusion des membranes, mais elles n'interagissent qu'avec les syntaxines, avant la formation du complexe des SNAREs. Un autre type de protéine vésiculaire, les synaptotagmines, auraient un rôle à jouer, entre autres, dans l'exocytose rapide de type « kiss and run » que l'on retrouve dans certaines synapses lorsque la vésicule est déjà ancrée à la membrane (Suudhof 2008).

Dans le système nerveux, les protéines vésiculaires les plus abondantes sont la synaptobrévine 1 et la synaptobrévine 2. On retrouverait près de 70 synaptobrévines par vésicule, bien que seulement deux soient nécessaires à la fusion membranaire. Depuis une décennie, on sait que l'exocytose des neurotransmetteurs passe par une phase Ca^{2+} -dépendante, et qu'elle est sérieusement compromise si les synaptobrévines sont absentes de la vésicule. On sait aussi que les synaptotagmines répondent à l'influx de Ca^{2+} (Ramakrishnan et al. 2012).

Objectifs de recherche

En 2001, le laboratoire du Dr Guy Rouleau a commencé une collaboration avec l'Université Memorial située à St. John's, Terre-Neuve (Canada). Il s'agissait de trouver la cause génétique d'une maladie rare, se présentant comme une paraplégie spastique avec des composantes d'ataxie, un peu comme l'ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay.

Seulement trois familles étaient atteintes et, bien qu'originaires de la même péninsule, elles ne semblaient pas reliées.

La première étape, après l'évaluation diagnostique et la collecte d'ADN, a été de trouver le locus qui unit ces familles. En déterminant la région chromosomique d'intérêt pour une famille, on pouvait voir le mode de transmission génétique, ainsi que les paramètres comme la pénétrance allélique et la proportionnalité homme/femme. L'effet fondateur de la province étant connu, on pouvait s'attendre à ce que ces trois familles avec un phénotype rare partagent un ancêtre commun. Il fallait donc vérifier la présence de marqueurs génétiques dans les deux autres familles. Une fois établi que ces trois familles avaient des marqueurs spécifiques à la maladie en commun, la recherche d'une mutation rare dans les gènes du locus a débuté.

Le projet faisant l'objet de ce mémoire commence avec le séquençage de gènes candidats, aboutissant à la découverte d'une mutation. Des études génétiques ont suivi pour établir un lien entre la mutation et SPAX1. Cette mutation a ensuite été caractérisée afin de prouver qu'elle a un réel impact qui peut causer la maladie.

Chapitre 1 : Étude de liaison génétique

Familles et phénotype

Les trois familles (Figure 1 page 21, Figure 2 page 22, Figure 3 page 23) portées à l'attention du Dr Guy Rouleau il y a une dizaine d'années présentaient un phénotype particulier. À première vue, il s'agissait de paraplégie spastique héréditaire (HSP), mais il y avait aussi des signes d'ataxie très présents. On connaissait l'ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay, dans laquelle les patients avaient une composante de paraplégie et une composante d'ataxie, mais on pouvait déjà établir que c'était une pathologie différente. D'abord, l'âge d'apparition des symptômes était plus tard, soit entre 10 et 20 ans, en moyenne. Ensuite, on pouvait observer une transmission dominante plutôt que récessive (Grewal et al. 2004; Meijer et al. 2002).

En détails, les personnes atteintes de cette maladie avaient une spasticité des membres inférieurs, des secousses involontaires de la tête, une difficulté à avaler (dysphagie), un trouble d'expression du langage dû à un trouble d'articulation (dysarthrie) et des anomalies oculomotrices telles : des saccades oculaires lentes, une difficulté à bouger le regard à la vertical, une rétraction de la paupière. Certaines personnes avaient aussi une exagération des réflexes (hyperréflexie), une augmentation (hypertonie) ou un trouble (dystonie) du tonus musculaire, des pieds creux (pes cavus), un faible relâchement des

organes (ptose) et une diminution des sensations de vibrations. C'est ce phénotype, avec hérédité dominante, qu'on appelle SPAX1, pour ataxie spastique 1 (Grewal et al. 2004; Meijer et al. 2002). Il a été estimé que la prévalence de SPAX1 à Terre-Neuve est de 21,6/100 000 (Grewal et al. 2004), soit près de deux fois plus que les ataxies héréditaires et les paraplégies spastiques héréditaires réunies dans l'étude norvégienne (Erichsen et al. 2009). Suite à la publication de ce phénotype en 2002, d'autres collaborateurs ont envoyé des échantillons d'ADN puisque leur patient semblait présenter les mêmes signes. Le laboratoire a donc eu accès à une famille supplémentaire (Figure 4 page 24) provenant de Terre-Neuve et à trois individus habitant en Ontario (Canada). Ces patients et cette famille n'ont fait l'objet d'étude que dans le présent mémoire.

Études génétiques

En utilisant l'une des trois premières familles (Figure 2 page 22), il a été possible de déterminer un locus partagé par tous les personnes atteintes. Pour ce faire, les 22 autosomes des membres clés de cette famille ont été criblés avec des microsatellites. L'étude de liaison génétique a servi à établir quels allèles étaient partagés par tous les gens atteints. Pour ce faire, on a estimé : la prévalence de la maladie dans la population de Terre-Neuve à 1/10 000 ; la pénétrance, c'est-à-dire la probabilité qu'une personne porteuse de l'allèle soit malade, à 90% ; les fréquences alléliques établies par le Centre d'Étude du Polymorphisme Humain (CEPH) comme étant celles présentes dans la population ; et une fraction de

recombinaison égale entre les hommes et les femmes. Avec tous ces paramètres et les résultats du génotypage de microsatellites, il a été possible de déterminer, à l'aide d'un calcul statistique (lod score), un locus sur le bras court du chromosome 12, à la bande cytogénétique 13 (12p13) (Meijer et al. 2002).

Le locus *SAX1* pour « spastic ataxia locus », maintenant connu sous le nom *SPAX1*, était à l'origine 3,7 Mb. Ce locus a été testé dans les deux autres familles ; la plus grande présentait une liaison génétique statistiquement significative et la plus petite une liaison génétique suggestive. À l'aide de nouveaux marqueurs, il a été possible de réduire la région à 1,9 Mb, contenant 53 gènes et pseudo-gènes. Parmi eux, on retrouvait le gène *atrophine 1* (*ATNI*), qui cause l'atrophie dentato-rubro-pallido-luisienne (DRPLA). C'est ce premier gène qui a été séquencé dans la recherche pour un gène candidat (Grewal et al. 2004; Meijer et al. 2002).

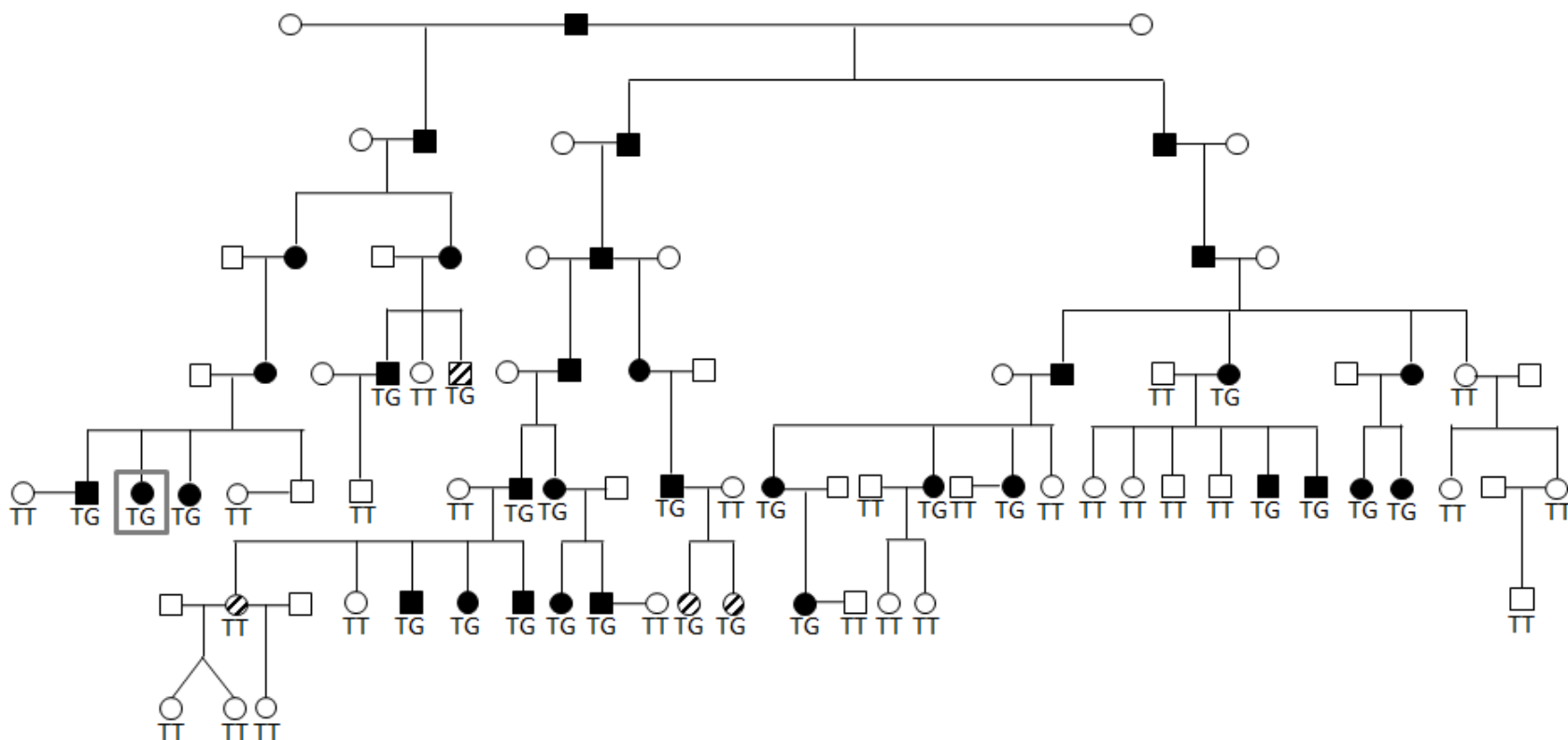


Figure 1 : Pédigrée de la famille 13. Les individus en noir sont cliniquement atteints. Les individus hachurés ont un diagnostic incertain. Les individus en blanc sont cliniquement non atteints. Le génotype de chaque individu est indiqué sous le symbole. La mutation identifiée entraîne le changement TT > TG. Le proposant est encadré.

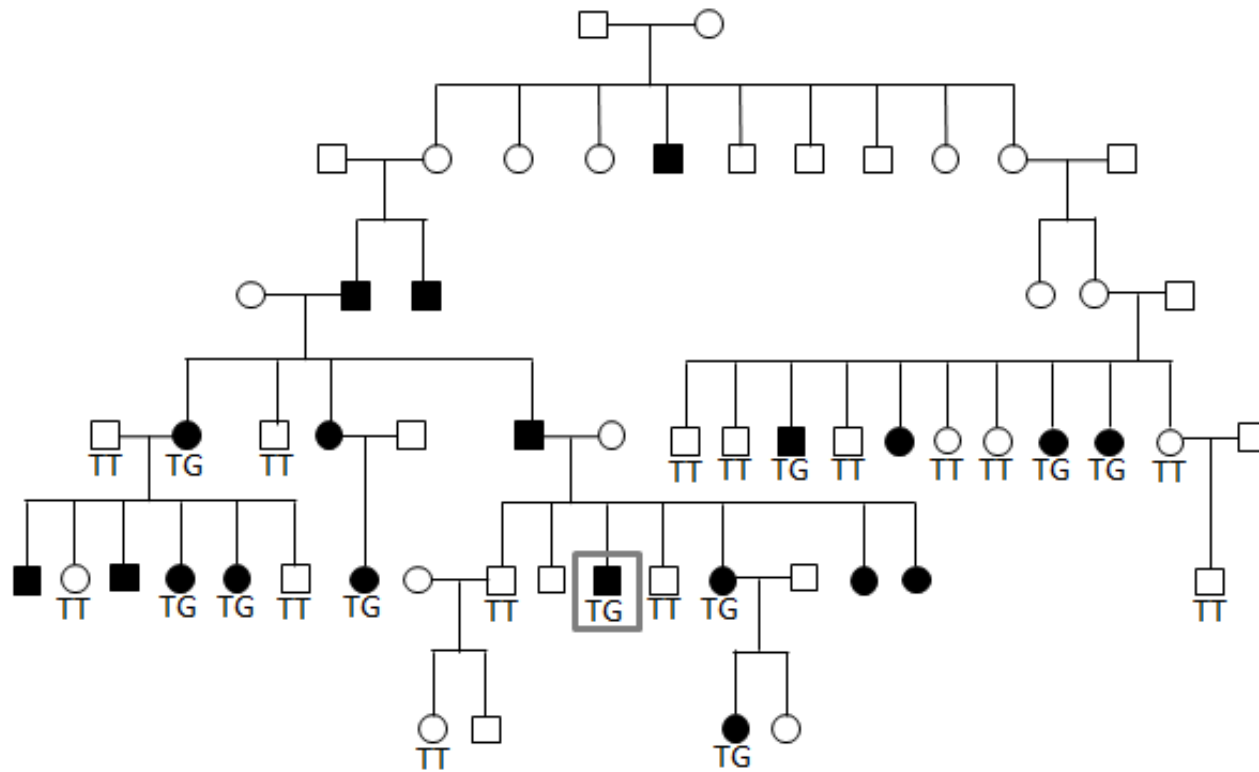


Figure 2 : Pédigrée de la famille 71. Les individus en noir sont cliniquement atteints. Les individus en blanc sont cliniquement non atteints. Le génotype de chaque individu est indiqué sous le symbole. La mutation identifiée entraîne le changement TT > TG. Le proposant est encadré.

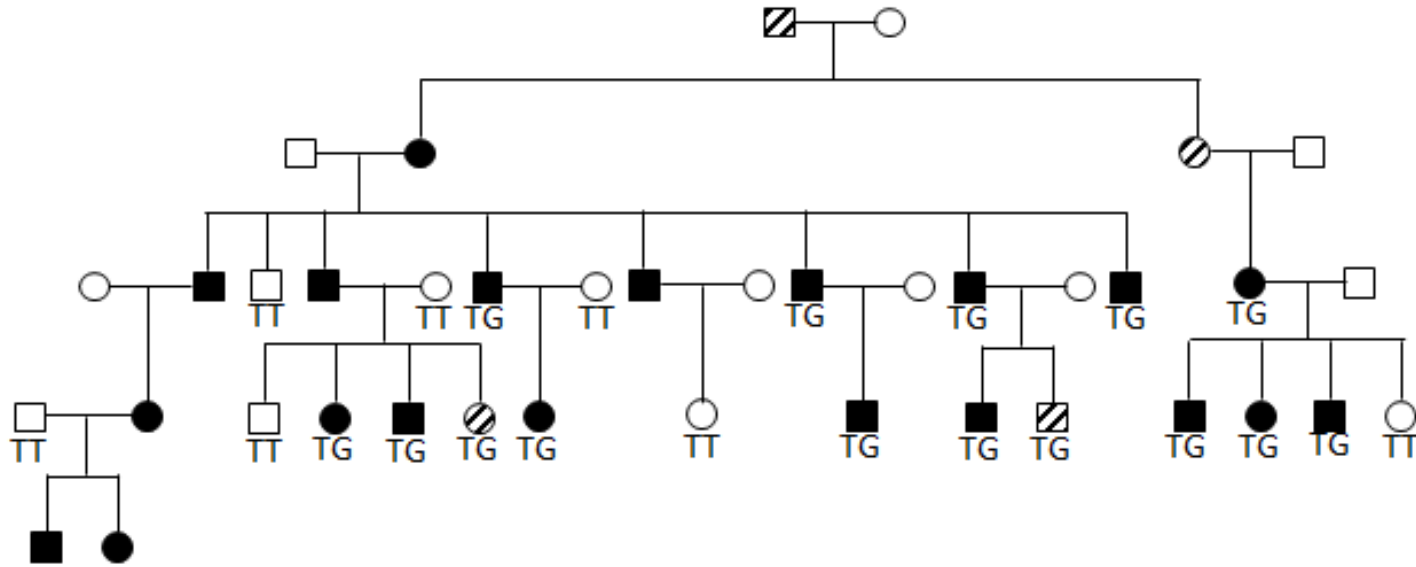


Figure 3 : Pédigrée de la famille 27. Les individus en noir sont cliniquement atteints. Les individus hachurés ont un diagnostic incertain. Les individus en blanc sont cliniquement non atteints. Le génotype de chaque individu est indiqué sous le symbole. La mutation identifiée entraîne le changement TT > TG.

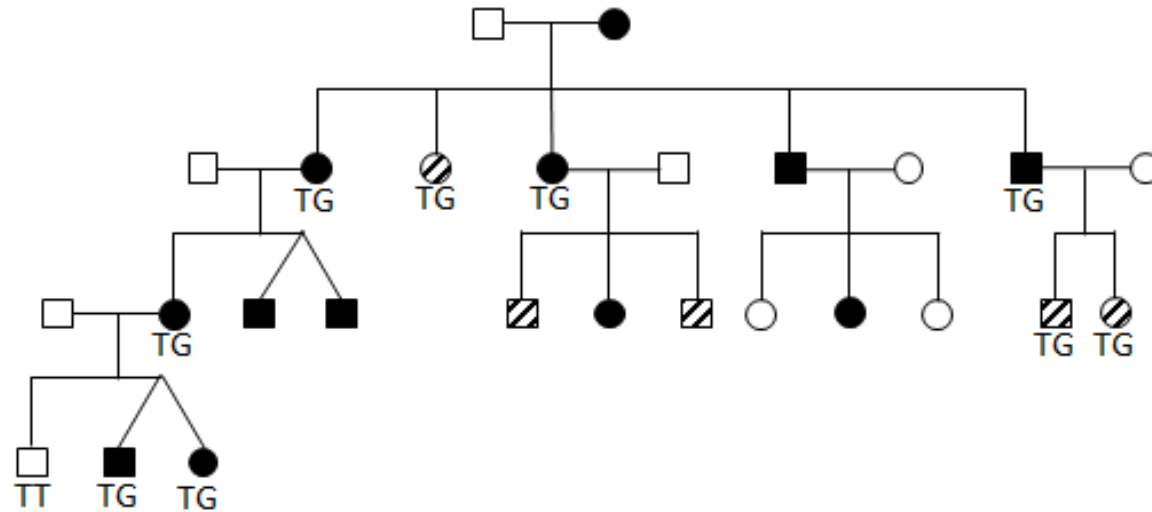


Figure 4 : Pédigrée de la famille FSPAT6. Les individus en noir sont cliniquement atteints. Les individus hachurés ont un diagnostic incertain. Les individus en blanc sont cliniquement non atteints. Le génotype de chaque individu est indiqué sous le symbole. La mutation identifiée entraîne le changement TT > TG.

Chapitre 2 : Article

Cynthia V. Bourassa : Séquençage de gènes candidats, séquençage des membres des familles, ainsi que des proposants et des contrôles ; essais infructueux de RT-PCR et d'immunobuvardage de type Western ; toutes les expériences pour tester l'épissage ; rédaction du manuscrit

Inge A. Meijer : Séquençage de gènes candidats ; révision critique du manuscrit

Nancy D. Merner : Séquençage des membres des familles ; révision critique du manuscrit

Kanwal K. Grewal : Gestion des échantillons (familles et contrôles) en provenance de Terre-Neuve

Mark G. Stefanelli : Évaluation de patients

Kathleen Hodgkinson : Assistance technique et épidémiologique à Terre-Neuve

Elizabeth J. Ives : Coordination du projet à Terre-Neuve

William Pryse-Phillips : Évaluation de patients

Mandar Jog : Évaluation de patients

Kym Boycott : Évaluation d'un proposant

David A. Grimes : Évaluation d'un proposant

Sharan Goobie : Évaluation d'un proposant

Richard Leckey : Évaluation de patients

Patrick A. Dion : Conception du projet ; révision critique du manuscrit

Guy A. Rouleau : Conception du projet ; fourniture du matériel ; révision critique du manuscrit

***VAMP1* Mutation Causes chromosome 12p13 Hereditary Spastic Ataxia in Newfoundland Families**

Cynthia V. Bourassa,¹ Inge A. Meijer,¹ Nancy D. Merner,¹ Kanwal K. Grewal,² Mark G. Stefanelli,² Kathleen Hodgkinson,³ Elizabeth J. Ives,² William Pryse-Phillips,⁴ Mandar Jog,⁵ Kym Boycott,⁶ David A. Grimes,⁷ Sharan Goobie,⁸ Richard Leckey,⁹ Patrick A. Dion,¹ Guy A. Rouleau,^{1,10*}

¹The Centre of Excellence in Neurosciences, CHUM Research Center and the Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec H2L 2W5, Canada

²Discipline of Medical Genetics and Division of Neurology, Faculty of Medicine, Health Sciences Center, Memorial University, St. John's, Newfoundland and Labrador A1B 3V6, Canada

³Department of Clinical Epidemiology, Faculty of Medicine, Memorial University, St. John's, Newfoundland and Labrador A1B 3V6, Canada

⁴Department of Medicine, Faculty of Medicine, Memorial University, St. John's, Newfoundland and Labrador A1B 3V6, Canada

⁵Department of Clinical Neurological Sciences, London Health Sciences Centre – University Hospital, University of Western Ontario, London, Ontario N6A 5A5, Canada

⁶Department of Genetics, Children's Hospital of Eastern Ontario, Ottawa, Ontario K1H 8L1, Canada

⁷Department of Neurology, Ottawa Hospital, Ottawa, Ontario K1Y 4E9, Canada

⁸Medical Genetics Program of Southwestern Ontario Children's Hospital, London Health Sciences Centre – University Hospital, University of Western Ontario, London, Ontario N6A 5A5, Canada

⁹Department of Medicine, Faculty of Medicine, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia B3H 2Y9, Canada

¹⁰Sainte-Justine Hospital, Montreal, Quebec H3T 1C5, Canada

*Corresponding author

Guy A. Rouleau

CHUM Research Center

2099 Alexandre-DeSève Street, room Y-3633

Montreal, Quebec,

Canada, H2L 2W5

1-514-890-8000 (24699)

Soumis à The American Journal of Human Genetics (en révision) AJHG-D-12-00196R1

Abstract

Our group previously described and mapped to chromosome 12p13 a novel form of dominantly inherited hereditary spastic ataxia (HSA) in three large Newfoundland (Canada) families. The present report identifies the *Vesicle associated membrane protein 1* gene (*VAMP1*), which encodes for a critical protein for synaptic exocytosis, as the responsible gene. In total, fifty affected individuals from these families and three independent probands from Ontario (Canada), share the disease phenotype and a specific *VAMP1* mutation that disrupts a critical donor site for the splicing of *VAMP1* isoforms. This mutation leads to the loss of the *VAMP1A* isoform, which is the only *VAMP1* isoform expressed in the nervous system. This report is the first ever associating the well-studied *VAMP1* protein to a neurological disorder. Given the variable phenotype seen in these families, we believe that *VAMP1* should be tested for mutations in patients with ataxia or spastic paraplegia.

Report

Spastic ataxia 1 (SPAX1 [MIM 108600]) is a rare neurodegenerative disorder characterized by lower-limb spasticity and ataxia in the form of head jerks, ocular movement abnormalities, dysphagia, dysarthria and gait disturbance (Grewal et al. 2004; Meijer et al. 2002), starting at 10-20 years old. Other clinical features are supranuclear gaze palsy, hyperreflexia, hypertonicity, dystonia, pes cavus, mild ptosis and decreased vibration sense in lower limbs. The severity of the symptoms varies between individuals; life span

and cognition are not affected (Grewal et al. 2004; Meijer et al. 2002). This disease resembles both spinocerebellar ataxias (SCA [MIM 164400]) and hereditary spastic paraplegias (HSP [MIM 182600]), but is part of a distinct group: hereditary spastic ataxias (HSA). The first studies on three families from Newfoundland (Canada) affected with SPAX1 revealed an ancestrally shared haplotype on chromosome 12p13 (Grewal et al. 2004; Meijer et al. 2002). We now think a fourth family is related to them, due to their geographic origin (Figure S1 page 29).

The Department of Genetics at Memorial University, following a referral from Dr. Stefanelli, separately ascertained all three families (Figure 1 page 21, Figure 2 page 22 and Figure 3 page 23). The clinical and genetic study of the families was approved by the Human Investigation Committee of Memorial University, and informed consent was obtained from each participant. A single neurologist (M.G.S) diagnosed most of the family members and blood was collected for DNA analyses. More recently, Dr. Jog ascertained an additional family (Figure 4 page 24) (with a Newfoundland origin), and other neurologists (K. B., D. A. G., S. G.) identified three single cases from Ontario, all of whom presented with a similar SPAX1 phenotype. The collection of samples and genetic studies were approved by the relevant ethic committees and informed consent was obtained from all subjects.



Based on original map by Norman Einstein http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Gander_Lake_map.png

Figure S1 : Carte géographique de Terre-Neuve (Canada). Le carré indique la localisation de la province. Les ellipses indiquent où les probands et membres des familles vivent présentement. Les flèches pointent l'endroit d'où les quatre familles originent.

Licence



Vous avez la permission de copier, distribuer et modifier ce document selon les termes de la [GNU Free Documentation License](#) version 1.2 ou toute version ultérieure publiée par la [Free Software Foundation](#), sans sections inaltérables, sans texte de première page de couverture et sans texte de dernière page de couverture. Un exemplaire de la licence est inclus dans la section intitulée [GNU Free Documentation License](#).

A mutation-screening panel was established that comprised of two affected individuals with the ancestral disease haplotype from two different families (Meijer et al. 2002) (Figure 1 page 21 and Figure 2 page 22, screened individuals are indicated) and an unaffected control. All coding exons and flanking intron regions of the 53 genes and predicted genes located in the 1.9 Mb disease haplotype were amplified by polymerase-chain reaction (PCR). The PCR conditions and primer sets are available upon request. The PCR products were sequenced at the McGill University and Génome Québec Innovation Centre (Montréal, Canada) and the sequences analyzed using Mutation Surveyor® v. 3.0 (SoftGenetics).

We searched for rare variants (less than 1% allele frequency) that were present exclusively in affected individuals on the mutation-screening panel. Variants that were previously reported in dbSNP were excluded from further analysis. The allele frequency of the remaining interesting variants was determined by screening Newfoundland population controls that were obtained through random phone dialing, as part of a colorectal cancer study (Green et al. 2007). Additionally, *in silico* programs (SIFT (Ng and Henikoff 2001), PolyPhen (Ramensky et al. 2002), PANTHER (Thomas et al. 2006)) were used to predict pathogenicity on protein structure/function and potential effect on the RNA splicing (BDGP (Reese et al. 1997), ESEfinder (Cartegni et al. 2003)). As part of the segregation analysis, all study participants (affected and unaffected) were screened for the particular variant.

Sequencing of all coding exons of the *SPAX1* locus, previously known as *SAX1* (Grewal et al. 2004; Meijer et al. 2002), revealed a single variant that was not present in dbSNP and heterozygous, consistent with a rare dominant disease. This variant is in the *Vesicle associated membrane protein* gene (*VAMP1* [MIM 185880]), at position g. 6,574,054 T>G (Figure 5a page 34). The primers amplifying the *VAMP1* gene are given in Table S1 (page 33). The specific variant segregated with the disease in all three families (see Figure 1 page 21, Figure 2 page 22 and Figure 3 page 23 for the genotypes) and was absent in 169 Newfoundland population controls and 48 spouses or unaffected family members. The presence of the variant was subsequently confirmed in FSPAT6 (see Figure 4 page 24 for the genotypes) and in the three single cases from Ontario. Eight people that are not definitely affected carry the mutation. In family 13 (Figure 1 page 21), one individual is possibly affected and two siblings are not known to be affected. In family 27 (Figure 3 page 23), one individual has gait disturbance and the other one is not known to be affected. In family FSPAT6 (Figure 4 page 24), the three people with unclear diagnosis have gait disturbance and/or downward gaze problems. These carriers are consistent with a 90% penetrance of the disease, which was the parameter used in the original linkage analysis (Meijer et al. 2002). Table 1 (Tableau V, page 32) summarizes the genetic results of the 110 samples screened, excluding the population controls, and each pedigree contains the information for each individual.

Tableau V. Résultats génétiques du séquençage des familles et des proposants

<i>Famille</i>	<i>Porteurs de la mutation</i>			<i>Non-porteurs de la mutation</i>				Total
	Atteints	Non-atteints	Diagnostic inconnu	Atteints	Non-atteints	Époux	Diagnostic inconnu	
FPSAT6	6	0	3	0	1	0	0	10
Fam27	13	0	2	0	4	3	0	22
Fam71	10	0	0	0	13	1	0	24
Fam13	21	0	3	0	17	9	1	51
Proposants	3	0	0	0	0	0	0	3
Total	53	0	8	0	35	13	1	110

Tableau S1. Amorces utilisées pour amplifier *VAMP1*

<i>Amplicon</i>	<i>Amorce sens</i>	<i>Amorce anti-sens</i>
Exon 1	GGGGTTGTCACCGTTATCC	CTTGGGGCGAGAGTTGTC
Exon 2	GCCCAGCTCCTTTCTTGTC	TCCCTTTTGTTTCCAAACTCC
Exon 3	TCCTTTCCTCTGTCTCTGGC	CCTGCACCATTAGAGGGAAG
Exon 4	TTCCCACTAGAGATGTGGCTC	GAAGACTCCAGGACCTTCCC
Exon 4/ <i>VAMP1D</i>	TTCCCACTAGAGATGTGGCTC	CATGAATGTGGATGGCAATG
Exon 5A	GACCTGAATGTCTGGTAACTTGG	CTGGTCCAGGAAGGAAAGC
Exon 5B	TTGAACCACCCTTTCCTGTC	TCAGAGGGACAGAAACCCAG
3'UTR_1	TGGGAGGAGAAGAGTATCGG	TTTAACGAGGGCAAGGAGTG
3'UTR_2	CCCAGTTAATTGTTGGCATAAAG	CCCACATTAATAGCCCATCC
3'UTR_3	TGGAGAAGAACCACCACTGTC	GCTGACCTAAAGCGACATGAG

La rangée mise en surbrillance correspond à la paire d'amorces nécessaire pour amplifier la mutation g. 6,574,054 T>G.

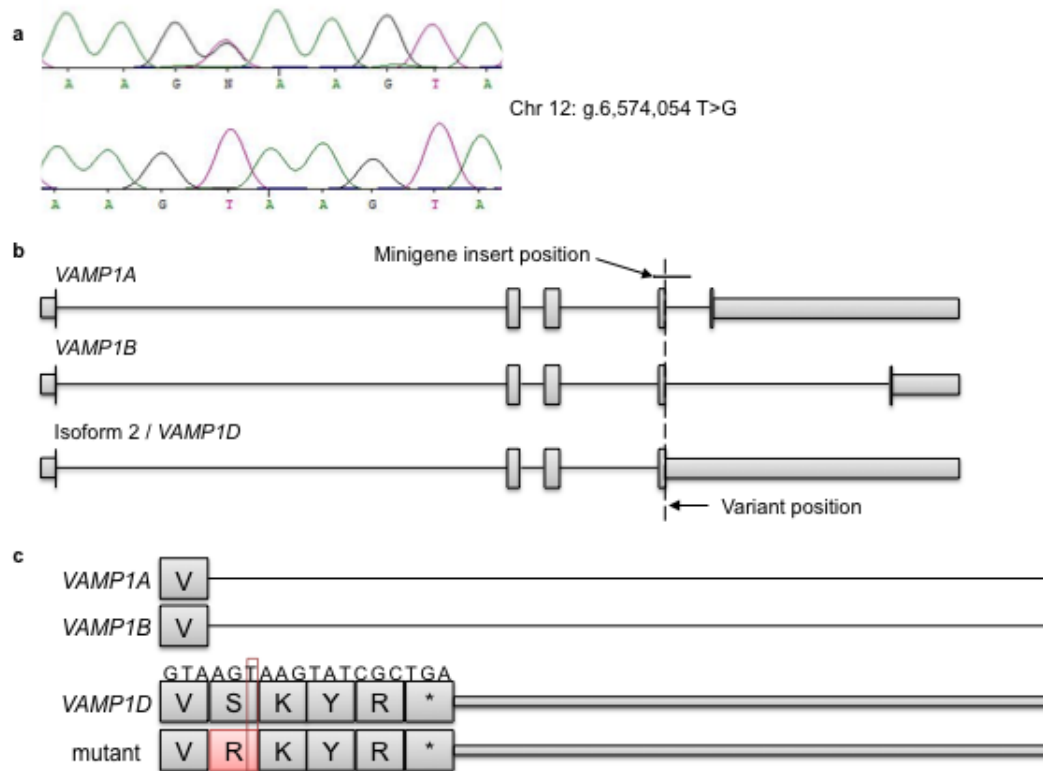


Figure 5 : *VAMP1*, du gène à la protéine. (A) Chromatogramme du variant g. 6,574,054 T>G issu de l'AND d'un patient, comparé à un contrôle. (B) Représentation des trois isoformes humaines annotées de *VAMP1*. Les boîtes plus larges sont des exons, les boîtes moyennes sont des UTRs et les lignes sont des introns. La position du variant et de l'insert sont indiquées. (C) Grossissement de la région chromosomique du variant, avec les séquences d'acides aminés des isoformes humaines annotées et la séquence résultant de la mutation.

VAMP1 has three annotated isoforms, *VAMP1A* (NM_014231.3), *VAMP1B* (NM_016830.2) and *isoform2/VAMP1D* (NM_199245.1) that only differ by their last exon (Figure 5b page 34). In *VAMP1A* and *VAMP1B*, the mutation is at position c. 486 + 2 T>G and in *VAMP1D* it is at position c. 488 T>G. The *in silico* validation predicted that this g. 6,574,054 T>G variant would disrupt mRNA splicing because it changes the GT splicing donor site for GG in both *VAMP1A* and *VAMP1B*.

Lymphoblastoid cell lines derived from patients were used in RT-PCR and Western blot experiment to confirm the impact of the identified mutation at the RNA and protein levels. However, the expression of *VAMP1* in these cells was too low for either of these approaches. Unfortunately, no autopsies material was available to conduct expression studies.

The mutation impact on normal splicing was thus assessed using two *VAMP1* minigenes (wild-type and mutant alleles) that were amplified from a patient's genomic DNA (proband of family 13, Figure 1 page 21); the two minigenes spanned from intron 3 to intron 4 (Figure 5b page 34). Primer sequences and conditions are available in Table S2 (page 36). PCR products were separately inserted into pENTR™D-TOPO® (45 min at 24°C following manufacturer's conditions, Invitrogen); transformed in *E. Coli* (One Shot® TOP10 chemically competent, Invitrogen). Plasmids from the resulting colonies were digested using the restriction enzyme HindIII (Invitrogen) and those with the correct size

inserts were sequenced to confirm the presence of either the wild-type or the mutated *VAMPI* alleles.

Tableau S2. Amorces et conditions utilisées pour créer l'insert du minigène

	<i>Concentration finale</i>	<i>Température</i>	<i>Temps</i>	<i>Cycles</i>
H ₂ O	Jusqu'à 50 µl	98 °C	30 s	1
Tampon 5X Phusion HF (NEB)	1X	98 °C	10 s	
dNTPs	200 µM	65 °C -60 °C	30 s	10
Amorce sens 10 µM	0.2 µM	72 °C	1 min	
Amorce anti-sens 10 µM	0.2 µM	98 °C	10 s	
ADN Polymérase Phusion (NEB)	0.5 U	60 °C	30 s	35
ADNg	100 ng	72 °C	1 min	
		72 °C	10 min	1
Amorce sens	TAGAGATGTGGCTCTTTTCCTCATTC			
Amorce anti-sens	CTATGCTGTGTGTCACTGGCTT			

One mutant and one wild-type clone were selected for the LR reaction in pSPL3B_RFA, a modified pSPL3 vector (Invitrogen). The cloning site of this vector is flanked by two constitutive exons from the rabbit beta-globin gene (NM_001082260.2). The LR reactions were performed using Gateway® LR Clonase® II (Invitrogen), following the manufacturer's protocol. The vectors were added to competent X11 blue *E. coli* (Stratagene). Enzymatic digestion and sequencing of the plasmid were done to confirm the integrity of the two inserts. Two independent colonies of each insert (mutant and wild type) were selected and bacterial cultures were grown, in order to prepare a larger amount of plasmid with the QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen). The sequence of the two inserts were confirmed before their transient expression in mammalian cells.

COS7 cells were plated in 6-well plates, each containing 2×10^5 cells in DMEM supplemented with 10% inactivated FBS, 24 hours before they were separately transfected with the two vectors containing the minigenes. Transfections were done using Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol, except for a lesser amount of DNA used, 2 µg. Cells were harvested 48h after transfection and homogenized in TRIzol® Reagent (Invitrogen) for RNA isolation, following the manufacturer's protocol. The cDNA was synthesized using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen), in a 40-µl reaction. GAPDH was used as a control for cDNA quantity. The RT-PCR of the studied variant was done in a 50 µl reaction with beta-globin primers: 5' primer 5'TCTGAGTCACCTGGACAACCT and 3' primer

5'ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC. PCR products were loaded on agarose gel; bands extracted and purified using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). The purified products were sent for sequencing and the sequences analyzed using SeqMan™II (DNASTAR Inc.).

These results revealed that, with the wild-type allele (allele T), a ~300 bp product predicted to arise from normal splicing was present. Also seen with the wild-type allele, there was a second product of ~400 bp. By opposition, the corresponding RT-PCR reactions prepared with the mutant allele cDNA (allele G at the variant position) only showed this ~400 bp product (Figure 6a page 39). This observation fully supports our original prediction about the impact of the g. 6,574,054 T>G mutation on normal splicing. The ~400 bp fragment in cells expressing the wild-type minigene is likely the consequence of the minigene system which would have forced the use of any possible splicing sequence present; moreover the usual splice site of *VAMPI* in intron 4 has been shown to be a weak donor site (Mandic et al. 1997). The sequencing of the ~400 bp band revealed that another splicing donor site was used (Figure 6b page 39). This downstream *VAMP1A* splice site is 99 bp after the variant position and at the protein level, the resulting amino acid sequence due to aberrant splicing would be similar to one of the isoform 2/VAMP1D as there is an in-frame stop codon before the splicing site. Furthermore, the mutant cDNA would produce a VAMP1D protein containing a missense mutation (p. Ser114Arg) (Figure 5c page 34) predicted to be damaging to the protein.

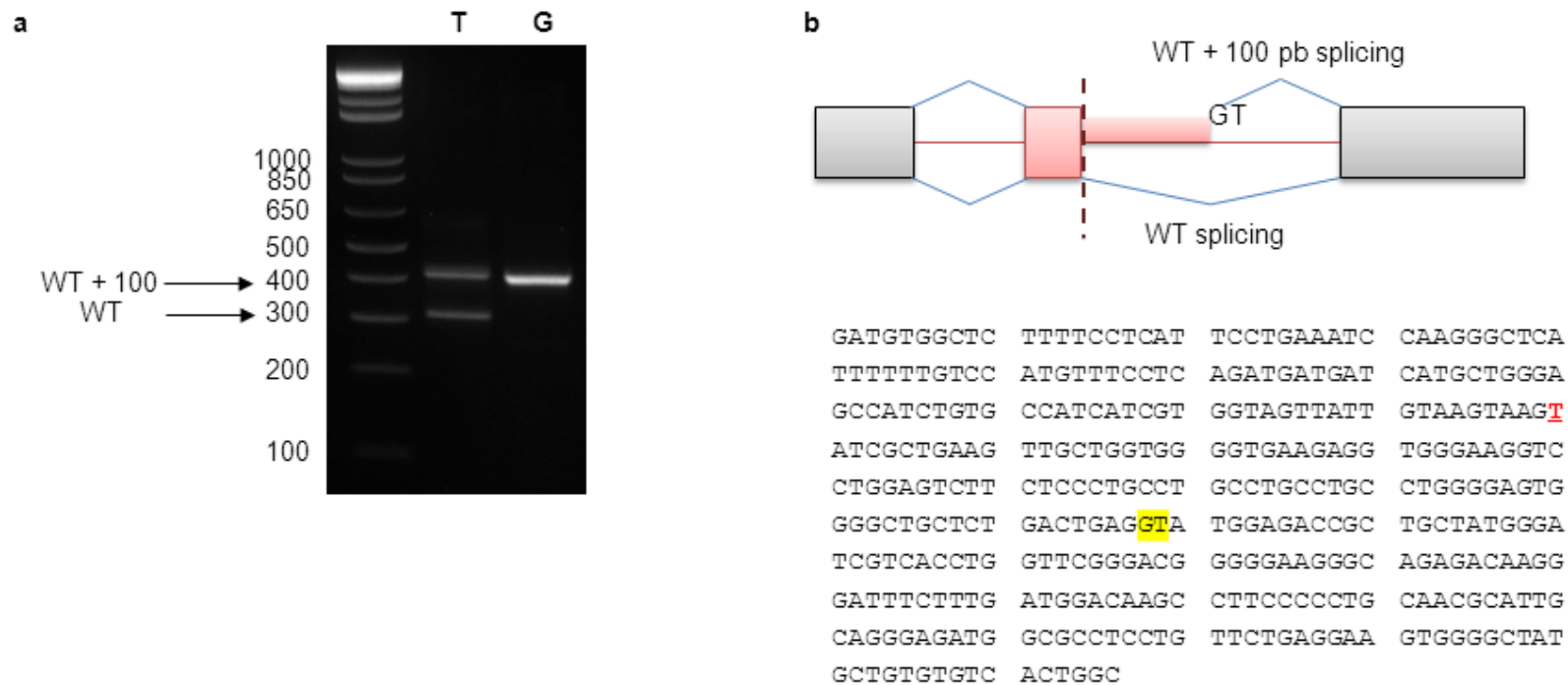


Figure 6 : Expériences d'épissage de l'ARN extraite des cellules COS7 transfectées. (A) Résultat du gel d'agarose du RT-PCR sur l'ARN extraite des cellules COS7 transfectées avec un minigène *VAMPI*. L'allèle présent dans l'insert est indiqué au-dessus de la colonne correspondante. (B) Représentation de la portion du plasmide importante pour le RT-PCR. Les exons de la bêta-globine sont en gris, les épissages prédits sont représentés par des lignes bleues et la position du variant est indiquée par la ligne rouge pointillée. L'insert, en rouge, comporte des introns (lignes) et un exon (boîte plus large). La boîte moyenne représente les nucléotides ajoutés lors de l'épissage anormal. La séquence indiquée est celle de l'insert, avec la mutation en rouge et le site donneur d'épissage anormal en jaune.

The neuronal VAMPs are involved in the synaptic vesicle cycle at the presynaptic nerve terminal. They are anchored in the vesicle membrane by their C-terminal domain and interact with synaptophysin prior to docking of the vesicle. When docking happens, they bind the complex SNAP-25 and syntaxin to form the synaptic core complex, starting the cascade of protein-protein interactions leading to neurotransmitter exocytosis. Several clostridial toxins are known to cleave VAMP proteins, namely tetanus toxin and botulinum toxins B, D, F and G. These toxins block the release of neurotransmitters, either in central nervous system or peripheral nervous system, arguing that VAMPs are essential for exocytosis (Sudhof 1995; Yamasaki et al. 1994).

VAMP proteins have been extensively studied using rat (*Rattus norvegicus*) models, although the electric ray (*Torpedo californica*) was the first organism in which *Synaptobrevin1* (*VAMP-1* or *SYB_TORCA*) was reported (Baumert et al. 1989; Trimble et al. 1988). The first synaptobrevin protein discovered (*Vamp1*) was reported to be expressed in the nervous system and endocrine cells, and it was also found that the rat genome contains two different genes encoding two similar proteins, *Vamp1* and *Vamp2* (Baumert et al. 1989; Elferink et al. 1989; Trimble et al. 1988); both expressed in the nervous system but at distinct localizations. *Vamp1* is expressed in the rat cerebellum, a structure known to be involved in ataxias in human (Bird 1993). The protein is also present in the rat brain stem and spinal cord, more specifically in the nuclei controlling eye movements, tongue movements, swallowing and limb movements (Goshgarian 2003; Purves 2001; Trimble et

al. 1990). All these central nervous system structures are consistent with some of the SPAX1 symptoms.

A few years after the original report describing *Vamp1*, the use of an alternative splice site was shown to underlie a distinct isoform which was henceforth named *Vamp1b*. This second isoform is exclusively expressed in non-neuronal rat tissues, like kidney, spleen, liver, parotid and pancreas (Mandic et al. 1997). The region of isoform *Vamp1b* that diverged from the original isoform, now termed *Vamp1a*, was in the C-terminal of the protein. The authors suggested that the splicing was tissue specific; the normal splicing being disrupted due to a weak 5'-donor splicing motif (Mandic et al. 1997). In this last isoform, exon 4 continues, leading to a product ~400 bp larger. Moreover, three years ago, another group found a *Vamp1* isoform specific to the rat's cochlear nucleus, termed *Vamp1nv*, that again diverges only in the C-terminal of the protein (Friedland et al. 2008).

In 1999, a report by Berglund (Berglund et al. 1999) and colleagues identified six distinct human *VAMPI* isoforms but only three of these are presently listed in the human genome (GRCh37/hg19). The human *VAMP1A* (NM_014231.3) isoform is mostly expressed in the nervous system (Berglund et al. 1999) and this isoform has substantial homology to the electric ray *SYB_TORCA* and rat *Vamp1a* protein isoforms. Human *VAMP1B* (NM_016830.2) is an isoform with a broad tissue expression (e.g. T cells, neutrophils, fibroblasts, liver cells, endothelial cells and more) but noticeably not expressed

in the human brain ¹⁷. In fact, the expression of human VAMP1A and VAMP1B are believed to be, to a certain extent, mutually exclusive ¹⁷. In humans the *VAMP1A* and *VAMP1B* isoforms encompass the same first four exons but the following and last exon, which carries a mitochondrial targeting signal in *VAMP1B*, is distinct between these two isoforms (Isenmann et al. 1998; Kim et al. 1999). The third human *VAMP1* isoform is *isoform2/VAMP1D* (NM_199245.1), which is almost identical to the rat *Vamp1b*, therefore probably not expressed in the nervous system. In this third isoform, the translation of the fourth exon continues until it reaches a stop codon, 12 nucleotides downstream (c. 498). The normal donor site located at the end of exon 4 (c. 486 + 2), which is critical for the differential isoform splicing events, is the donor site mutated in the SPAX1 patients. Therefore, the mRNA normal splicing of both *VAMP1A* and *VAMP1B* are likely to be affected.

We predict that in patients, the mutation leads to alternative splicing with the formation of an abnormal inactive isoform in neurons, resulting in haploinsufficiency. Therefore, there would be less neurotransmitter exocytosis in specific regions of the brain, causing the symptoms of *SPAX1*. There is a spontaneous null *Vamp1* mouse called lethal-wasting (*lew*), in which a mutation causes the truncation of half of the protein, hence no *Vamp1* is produced. The phenotype in homozygous mice is that of mostly neurological defects and the animals die at post-natal day 15 (Nystuen et al. 2007). It appears that in the mouse *Vamp1* encodes for a protein that is essential for the function of the neuromuscular

junction, specifically for Ca^{2+} sensitivity (Y. Liu et al. 2011b). Other synapses were not studied, but one could speculate that the role of VAMP1 in the central nervous system is likely to be similar. *Vamp1* heterozygous mice appear normal; however a detailed assessment of the impact on the brain was not done (W. Lin, personal communication).

We have identified a novel variant in *VAMP1* that segregates in four HSA families from Newfoundland and is present in three additional probands. This variant is absent from 169 Newfoundland population controls, where the families originate. Using a minigene, we established that the variant has an effect on the splicing of the RNA affecting primarily a neuron-specific isoform. We suspect that the amount of this neuron specific VAMP1 isoform is reduced by half, leading to the neurological deficiencies observed clinically. Patients with HSA, HSP or ataxia, who have ancestral links in Newfoundland, should be tested for this gene. It remains to be determined if mutations in this gene may be found in patients outside of this founder effect.

Supplementary information

Contains four figures (three pedigrees and a map) and two tables

Acknowledgments

The authors would like to thank the family members and the volunteer controls, as well as Dr. Roger Green for kindly providing the latter ones. We also thank Weichun Lin for information about the heterozygous mouse. Special thanks to Loubna Jouan and Anna Szuto for their technical assistance. C.V.B. is supported by the Canadian Institutes for Health Research, through the Master's Award: Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships. G.A.R. holds the Canada Research Chair and a Jeanne-et-J.-Louis-Levesque Chair for the Genetics of Brain Diseases.

Web Resources

dbSNP <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) <http://www.omim.org>

UCSC Genome browser <http://genome.ucsc.edu/>

References

Voir les références appropriées dans le mémoire

Discussion

Rappel clinique

Les ataxies spastiques héréditaires forment un groupe de maladies neurodégénératives qui ont des caractéristiques phénotypiques communes avec les ataxies héréditaires et les paraplégies spastiques héréditaires. Les traits généraux des ataxies spastiques héréditaires sont une spasticité des membres inférieurs et une ataxie généralisée, c'est-à-dire une difficulté de coordination des mouvements, souvent doublés d'une dysarthrie, d'anomalies des mouvements oculaires et une posture instable (J. P. Bouchard et al. 1998; Grewal et al. 2004; Meijer et al. 2002). Chez les patients atteints de SPAX1, on retrouve une hyperréflexivité des membres, des problèmes de tonicité (hypertonie ou dystonie), des pieds creux, un léger abaissement des paupières supérieures (ptosis) et une diminution des sensations de vibration dans les membres inférieurs (Grewal et al. 2004; Meijer et al. 2002).

SPAX1 est la première et la seule ataxie spastique à hérédité autosomique dominante identifiée à ce jour. Trois familles originaires de la péninsule d'Avalon, à Terre-Neuve, ont servi à décrire le phénotype (Grewal et al. 2004; Meijer et al. 2002). Depuis, des neurologues ont examiné trois proposants vivants en Ontario, ayant des membres de leurs familles originaires de Terre-Neuve, qui avaient les mêmes caractéristiques. Une quatrième famille provenant de la péninsule d'Avalon a aussi été identifiée. Ces nouveaux patients se

sont avérés porteurs de la même mutation que les trois familles « SPAX1 », chez qui la mutation ségrégeait de façon parfaite avec la maladie. De plus cette mutation semble absente de la population générale de Terre-Neuve, indiquant une spécificité à la maladie.

Le fait que quelques membres des familles étaient porteurs de la mutation sans pour autant être atteints de la maladie peut sembler *a priori* dérangent. Pourtant, dans les maladies mendéliennes, il est très clairement admis qu'on retrouve le phénomène de pénétrance réduite, même dans les populations à effet fondateur (Charrow 2004). Lorsqu'on parle de pénétrance, c'est que l'on évalue le pourcentage d'individus porteurs d'une mutation qui sont effectivement atteints par la maladie. Ici, lors des premières études génétiques, on avait alloué que 90% des gens hypothétiquement porteurs de la mutation étaient atteints de SPAX1 (Meijer et al. 2002). C'est avec ce paramètre que le locus 12p13 a été découvert et, globalement, on ne retrouve que trois individus (3/61) qui n'ont aucun symptôme avec la mutation. Les cinq autres ont tous des problèmes apparentés au phénotype SPAX1. Il sera intéressant d'obtenir des mises à jour sur ces patients, afin de vérifier si les symptômes se sont développés ou aggravés avec le temps.

La grande famille des synaptobrévines

La synaptobrévine ou VAMP (vesicle-associated membrane protein) est une protéine retrouvée dans plusieurs tissus chez les mammifères (Berglund et al. 1999; Friedland et al. 2008; Isenmann et al. 1998; Mandic et al. 1997). C'est toutefois dans le système nerveux de la raie électrique qu'elle a été identifiée la première fois (Trimble et al. 1988). Quelques années après la caractérisation des gènes et la découverte que la protéine était dans les vésicules synaptiques (Baumert et al. 1989), son rôle a été mis en lumière grâce à des expériences utilisant des toxines clostridiennes, soit les toxines tétanique et botuliniques (Sudhof 1995; Yamasaki et al. 1994). Le botulisme se caractérise par une paralysie progressive, débutant dans les zones centrales (Zhang et al. 2010), alors que le tétanos se présente comme une rigidité musculaire et des spasmes (Ataro et al. 2011). Il était déjà connu que les toxines botuliniques agissent sur la jonction neuromusculaire en bloquant la libération d'acétylcholine, alors que la toxine tétanique bloque la libération des neurotransmetteurs inhibiteurs dans le système nerveux central (Yamasaki et al. 1994). Yamasaki et coll. ont par la suite montré que ces différentes toxines clostridiennes clivaient les synaptobrévines, entraînant un blocage de la libération des neurotransmetteurs cibles (Yamasaki et al. 1994) et donc l'apparition de la maladie.

Il existe différentes synaptobrévines (VAMPs) et parfois, on retrouve plusieurs isoformes d'une même protéine. Elles ont toutes un rôle sécrétoire, mais voici avec plus de

détails le rôle de chacune. *VAMP1* possède trois isoformes : *VAMPIA* (NM_014231.3) exprimé presque exclusivement dans le système nerveux ; *VAMP1B* (NM_016830.2) exprimé dans d'autres types de cellules, notamment les cellules endothéliales, les lymphocytes T et les hépatocytes, mais pas dans le cerveau (Isenmann et al. 1998) ; et *VAMP1D* (NM_199245.1) retrouvé dans les reins et des leucocytes (Berglund et al. 1999), ainsi que dans des glandes endocrines (Mandic et al. 1997). *VAMP2* (NM_014232.2) n'a qu'un isoforme, et c'est la synaptobrevine la plus exprimée dans le système nerveux (Trimble et al. 1990). On retrouve aussi *VAMP2* dans les mêmes types cellulaires que *VAMP1* (Isenmann et al. 1998; Rossetto et al. 1996). Les autres synaptobrevines sont exprimées dans différents tissus, mais très peu dans le système nerveux. C'est pourquoi elles ne seront que très brièvement traitées.

VAMP3 (NM_004781.3) est aussi appelée cellubrevine chez le rat. Cette protéine est exprimée de façon ubiquitaire, notamment dans les glandes endocrines, dans les poumons et les gonades (McMahon et al. 1993) et même dans les astrocytes (T. Liu et al. 2011a). *VAMP4* possède deux isoformes codants (NM_003762.4 et NM_001185127.1) qui ont été rapportés la première fois majoritairement dans le cœur, mais aussi dans d'autres tissus (Advani et al. 1998). *VAMP5* (NM_006634.2) est connue aussi sous le nom de myobrevine, dû au fait qu'elle soit exprimée dans les muscles squelettiques et le cœur et qu'elle soit nécessaire à la myogenèse (Zeng et al. 1998). *VAMP7* a été découverte dans plusieurs tissus (Advani et al. 1998) et possède trois isoformes codants (NM_005638.5,

NM_001145149.2 et NM_001185183.1) qui semblent être liés au trafic d'endosomes précoces (Steggmaier et al. 1999). La dernière synaptobrévine est exprimé dans les reins et se fait appeler endobrévine (*VAMP8*, NM_003761.4) puisqu'elle est liée au trafic des endosomes tardifs (Advani et al. 1998; Wong et al. 1998).

VAMP1 dans le système nerveux

VAMP1 est ici la synaptobrévine d'intérêt puisque c'est dans ce gène qu'on retrouve la mutation causant l'ataxie spastique SPAX1. La position du changement de nucléotide (c. 486 + 2) indique que la mutation change le site donneur d'épissage. Cela est vrai pour les isoformes *VAMP1A* et *VAMP1B*, mais pas pour l'isoforme *VAMP1D* pour qui la position est c. 488. Tel que mentionné précédemment, *VAMP1A* est exprimée dans le système nerveux et certaines études ont montré que ce serait le seul des isoformes de *VAMP1* qui est exprimé dans le cerveau (Isenmann et al. 1998; Mandic et al. 1997). Un épissage inadéquat de *VAMP1A* pourrait alors empêcher la protéine d'être fonctionnelle dans les neurones où elle est exprimée. Il est donc pertinent de s'attarder à la distribution de VAMP1 dans le système nerveux, puisque SPAX1 est une maladie neurodégénérative, affectant la voie cortico-spinale et possiblement le cervelet. D'ailleurs, des lésions de la voie cortico-spinale provoquent de la spasticité et de l'hyperréflexivité (Goshgarian 2010).

Au moment où les études d'expression différentielle dans le système nerveux entre VAMP1 et VAMP2 ont été réalisées, on ne connaissait pas les trois isoformes de VAMP1. Par contre, avec la séquence d'acides aminés présentée dans l'article de Trimble et coll., on constate qu'il s'agit de l'homologue murin de VAMP1A (Trimble et al. 1990). On peut donc dire que VAMP1A est exprimé préférentiellement dans le cervelet, le tronc cérébral et la moelle épinière. Dans celle-ci, la lamina IX et les laminae IV à VIII, présentent la protéine VAMP1A (Trimble et al. 1990). La lamina IX est celle où l'on retrouve les motoneurones, tandis que les laminae V à VIII forment la voie ascendante proprioceptive qui contacte les motoneurones directement. La lamina IV fait partie de la voie dorsale, ascendante (Gilerovich et al. 2008). Dans l'étude de Trimble et coll., seule la matière grise a été hybridée avec la sonde et la voie cortico-spinale fait partie de la matière blanche (Goshgarian 2010; Trimble et al. 1990). Par contre, la voie cortico-spinale forme des synapses avec les neurones de la matière grise, en particulier les interneurones et les motoneurones (Goshgarian 2010), donc on pourrait supposer que la protéine VAMP1 retrouvée dans la matière grise provient en fait des neurones de la voie cortico-spinale. Dans les patients SPAX1, qui présentent une dégénérescence de la voie cortico-spinale (Grewal et al. 2004), la synapse sur les motoneurones et les interneurones ne se ferait présumément pas bien, entraînant des problèmes de motricité.

Au niveau du cervelet, VAMP1 est exprimé dans les noyaux cérébelleux profonds (Trimble et al. 1990), qui relaient l'information du cervelet vers le cortex moteur, afin de

vérifier la coordination du mouvement en cours. En cas de dommage au cervelet, une maladie apparaît : l'ataxie (Ghez and Thach 2000). Au niveau du tronc cérébral, voici quelques noyaux des nerfs crâniens où est exprimée VAMP1 et leurs fonctions (Purves 2001; Trimble et al. 1990). Ces structures sont choisies en fonction des liens évidents avec les symptômes de SPAX1, mis entre parenthèses.

- Les noyaux des grands hypoglosses, qui permettent les mouvements de la langue (dysarthrie)
- Les noyaux des nerfs faciaux, qui permettent les expressions faciales et les mouvements de la langue (dysarthrie)
- Les noyaux des nerfs oculomoteurs externes et communs, qui permettent le mouvement des yeux, en particulier à la verticale (anormaux chez les patients) et le mouvement des paupières (ptosis)
- Les noyaux des nerfs pathétiques, qui permettent le mouvement des yeux vers le bas (anormal chez les patients)
- Les noyaux des nerfs trijumeaux, qui innervent les muscles masticateurs, et donc les muscles phonateurs (dysarthrie)

En conclusion, Trimble et coll. proposent que VAMP1 soit dédiée aux voies motrices de la tête, du cou, de la face, de la mâchoire et de la langue, en plus des muscles squelettiques, puisque cela correspondrait à son patron d'expression dans le système nerveux (Trimble et al. 1990). Ils demeurent toutefois prudents quant à son rôle, puisqu'à cette époque on ne le connaissait pas.

Quelques années plus tard, il a été possible de préciser le rôle de la synaptobrévine dans la libération des neurotransmetteurs, qu'on savait défectueuse en présence de toxines

clostridiennes. D'abord, la synaptobrevine est ancrée à la membrane des vésicules et interagit avec la synaptophysine. Au moment de l'arrimage de la vésicule, le complexe synaptobrevine – synaptophysine se lie au complexe SNAP-25 – syntaxine et la synaptophysine est délogée. L'interaction entre la synaptobrevine, SNAP-25 et la syntaxine forme un nouveau complexe protéique très résistant qui entraîne la liaison d'autres protéines. Il a été proposé que les toxines mentionnées plus haut empêchent la formation de ce complexe très résistant, résultant du tétanos et du botulisme. De plus, c'est à ce moment que la vésicule devient sensible au Ca^{2+} , qui est nécessaire au mécanisme d'exocytose (Sudhof 1995). D'ailleurs, il a été montré que VAMP1 est la protéine qui permet cette sensibilité au Ca^{2+} , du moins à la jonction neuromusculaire (Y. Liu et al. 2011b). Les patients SPAX1 qui ont donc une protéine VAMP1A dysfonctionnelle dans leur système nerveux ne seront pas en mesure d'initier l'exocytose des neurotransmetteurs, d'où les problèmes de transmission de l'information conduisant aux différents symptômes.

Similitudes génétiques avec d'autres ataxies ou paraplégies

En reprenant le Tableau IV (page 13), on peut aisément classer la synaptobrevine dans la catégorie *Trafic membranaire et transport axonal*. En effet, l'exocytose des neurotransmetteurs est un processus qui implique la membrane présynaptique (Sudhof 1995). La seule ataxie dominante représentée dans cette catégorie est SCA5, une ataxie assez rare causée par le gène *SPTBN2*. Les symptômes cliniques de SCA5 sont ceux d'une

ataxie spinocérébelleuse pure et la protéine Beta-III spectrine est une protéine membranaire du cytosquelette, servant au transport des organites (Bauer et al. 2006). Il existe plusieurs paraplégies spastiques entrant dans la même catégorie, plus particulièrement dans l'activité des endosomes : SPG4, SPG6, SPG20 et SPG21 (Blackstone et al. 2011). C'est la sous-catégorie la plus pertinente à cause de l'idée de vacuole servant d'échange avec le milieu extracellulaire.

Les patients atteints de SPG4 présentent une paraplégie spastique « pure » et les mutations de la protéine spastine causent une diminution dans la rapidité du transport des vésicules (Fuerst et al. 2011). Pour SPG6, une autre paraplégie spastique « pure », les mutations de *NIPAI* causent une ségrégation de la protéine au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui empêche la protéine d'avoir son activité au niveau des endosomes précoces ; les effets montrés de cette mutation sont une mort neuronale induite par apoptose (Botzolakis et al. 2011). SPG20 est une HSP autosomique récessive où les patients ont plusieurs symptômes très peu ressemblants à une ataxie spastique, dans laquelle la protéine spastine pourrait ne plus engendrer la formation des gouttelettes lipidiques ou fonctionner avec les endosomes (Edwards et al. 2009). SPG21 est aussi une HSP autosomique récessive complexe, avec une variété de signes, où la maspandine ne pourrait plus trier les protéines issues des endosomes tardifs, ce qui entraînerait des problèmes dans des voies de signalisation impliquant des facteurs de croissance neuronaux (Soderblom et al. 2010).

Expériences complémentaires suggérées

Il existe une souris avec une mutation homozygote de *Vamp1* apparue spontanément (C3H/HeDiSnJ-*Vamp1*^{lew}/GrsrJ, The Jackson Laboratory). Cette mutation cause la troncation de près de la moitié de la protéine, ce qui est un changement plus radical que la mutation des patients SPAX1 (Nystuen et al. 2007). Ces souris décèdent 15 jours après leur naissance. Par contre, les souris hétérozygotes semblent normales (Y. Liu et al. 2011b). La première expérience à faire serait donc d'examiner le niveau d'expression de *Vamp1* dans l'encéphale des souris hétérozygote et l'effet potentiel d'une perte de *Vamp1* sur les axones. Comme les souris semblaient normales, on ne s'attendrait pas à quelque chose de drastique, mais peut-être qu'avec l'âge les souris hétérozygotes développeraient une spasticité au niveau des pattes arrière.

Aussi, s'il était possible d'avoir des extraits d'encéphale et de moelle épinière des patients, il serait pertinent de faire de la détection *in situ* de VAMP1A, afin de voir si la maladie est causée par une haploinsuffisance ou un effet dominant-négatif. Étant donné que les patients ont une durée de vie normale, on s'attendrait à voir une haploinsuffisance comme la cause de SPAX1, car les neurones atteints ne semblent pas totalement non-fonctionnels. Avec les patients, il serait aussi intéressant de s'interroger sur d'autres signes davantage sensitifs, étant donné la localisation de VAMP1 dans la moelle épinière.

Conclusion

En conclusion, l'ataxie spastique héréditaire SPAX1 est causée par une mutation hétérozygote rare dans le gène *VAMPI*, qui empêche la maturation normale de l'ARN en modifiant le site donneur d'épissage. L'effet de la mutation a été prouvé en utilisant un minigène, où le transcrit issu de l'allèle mutant ne présentait qu'une version plus longue et une absence du transcrit normal. Ce site est critique pour la formation de l'isoforme *VAMPIA*, le seul qui est présent dans le système nerveux. La localisation précise de la protéine synaptobrevine 1 concorde parfaitement avec les symptômes observés chez les patients, appuyant l'idée que ce gène est bel et bien le gène causal. De plus, des études ont montré que lorsque la synaptobrevine est clivée par les toxines clostridiennes, il n'y a plus d'exocytose des neurotransmetteurs, entraînant de la paralysie, de la rigidité et des spasmes. On sait maintenant que c'est parce que la synaptobrevine contribue à la formation du complexe protéique résistant qui arrime les vésicules synaptiques à la membrane présynaptique et qu'elle est nécessaire pour déclencher l'exocytose, en tant que protéine sensible au Ca^{2+} . Les patients auraient donc de la difficulté à transmettre les influx nerveux.

On retrouve quatre familles et trois proposants avec la même mutation dans *VAMPI*, et où cette mutation ségrège parfaitement avec le phénotype SPAX1. Ces gens sont tous originaires de la province de Terre-Neuve, majoritairement de la péninsule d'Avalon. On sait que la province de Terre-Neuve possède une population à effet fondateur

local, ce qui augmente le risque de souffrir de maladies génétiques rares, comme les ataxies spastiques héréditaires. Dans cette famille, SPAX1 est la seule à hérédité autosomique dominante et la plus connue est SACS, identifiée d'abord dans la population Canadienne-française et maintenant retrouvée partout dans le monde.

Les ataxies spastiques héréditaires ressemblent à deux familles de pathologies distinctes : les ataxies héréditaires et les paraplégies spastiques. On retrouve d'ailleurs des classes de protéines causales en commun entre ces trois familles, notamment le trafic membranaire et le transport axonal dont VAMP1 fait partie. Le fil était déjà tenu entre les ataxies héréditaires et les paraplégies spastiques héréditaires (Hedera 2009), alors avec les ataxies spastiques la distinction est encore plus difficile. C'est pourquoi le gène *VAMP1*, ainsi que les autres synaptobrévines et les protéines interagissant avec elles, sont des gènes candidats potentiels pour chacune des maladies qui demeure irrésolue dans ces trois familles.

Bibliographie

- Advani, R. J., et al. (1998), 'Seven novel mammalian SNARE proteins localize to distinct membrane compartments', *J Biol Chem*, 273 (17), 10317-24.
- Anderson, J. F., Siller, E., and Barral, J. M. (2010), 'The sarsin repeating region (SRR): a novel Hsp90-related supra-domain associated with neurodegeneration', *Journal of molecular biology*, 400 (4), 665-74.
- Anttonen, A. K., et al. (2005), 'The gene disrupted in Marinesco-Sjogren syndrome encodes SIL1, an HSPA5 cochaperone', *Nat Genet*, 37 (12), 1309-11.
- Ataro, P., Mushatt, D., and Ahsan, S. (2011), 'Tetanus: a review', *South Med J*, 104 (8), 613-7.
- Bakalkin, G., et al. (2010), 'Prodynorphin mutations cause the neurodegenerative disorder spinocerebellar ataxia type 23', *Am J Hum Genet*, 87 (5), 593-603.
- Banfi, S., et al. (1994), 'Identification and characterization of the gene causing type 1 spinocerebellar ataxia', *Nat Genet*, 7 (4), 513-20.
- Barbot, C., et al. (2001), 'Recessive ataxia with ocular apraxia: review of 22 Portuguese patients', *Arch Neurol*, 58 (2), 201-5.
- Basri, R., et al. (2007), 'Spectrum and prevalence of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in Hokkaido, the northern island of Japan: a study of 113 Japanese families', *J Hum Genet*, 52 (10), 848-55.
- Bauer, P., Schols, L., and Riess, O. (2006), 'Spectrin mutations in spinocerebellar ataxia (SCA)', *Bioessays*, 28 (8), 785-7.

- Baumert, M., et al. (1989), 'Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain', *EMBO J*, 8 (2), 379-84.
- Berglund, L., et al. (1999), 'VAMP-1 has a highly variable C-terminus generated by alternative splicing', *Biochem Biophys Res Commun*, 264 (3), 777-80.
- Bird, T. D. (1993), 'Hereditary Ataxia Overview', in R. A. Pagon, et al. (eds.), *GeneReviews* (Seattle (WA)).
- Blackstone, C., O'Kane, C. J., and Reid, E. (2011), 'Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway', *Nat Rev Neurosci*, 12 (1), 31-42.
- Botzolakis, E. J., et al. (2011), 'The effect of HSP-causing mutations in SPG3A and NIPA1 on the assembly, trafficking, and interaction between atlastin-1 and NIPA1', *Mol Cell Neurosci*, 46 (1), 122-35.
- Bouchard, J. P., et al. (1978), 'Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay', *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*, 5 (1), 61-9.
- (1979a), 'Electromyography and nerve conduction studies in Friedreich's ataxia and autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS)', *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*, 6 (2), 185-9.
- Bouchard, J. P., et al. (1998), 'Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay', *Neuromuscular disorders : NMD*, 8 (7), 474-9.
- Bouchard, R. W., et al. (1979b), 'Electroencephalographic findings in Friedreich's ataxia and autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS)', *The*

Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques, 6 (2), 191-4.

- Boukhris, A., et al. (2009), 'Tunisian hereditary spastic paraplegias: clinical variability supported by genetic heterogeneity', *Clin Genet*, 75 (6), 527-36.
- Bouslam, N., et al. (2007), 'A novel locus for autosomal recessive spastic ataxia on chromosome 17p', *Human genetics*, 121 (3-4), 413-20.
- Braverman, N., et al. (2002), 'Mutation analysis of PEX7 in 60 probands with rhizomelic chondrodysplasia punctata and functional correlations of genotype with phenotype', *Hum Mutat*, 20 (4), 284-97.
- Brkanac, Z., et al. (2009), 'IFRD1 is a candidate gene for SMNA on chromosome 7q22-q23', *Am J Hum Genet*, 84 (5), 692-7.
- Browne, D. L., et al. (1994), 'Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1', *Nat Genet*, 8 (2), 136-40.
- Cagnoli, C., et al. (2010), 'Missense mutations in the AFG3L2 proteolytic domain account for approximately 1.5% of European autosomal dominant cerebellar ataxias', *Hum Mutat*, 31 (10), 1117-24.
- Cali, J. J., et al. (1991), 'Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis', *J Biol Chem*, 266 (12), 7779-83.
- Campuzano, V., et al. (1996), 'Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion', *Science*, 271 (5254), 1423-7.

- Cartegni, L., et al. (2003), 'ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers', *Nucleic acids research*, 31 (13), 3568-71.
- Casari, G., et al. (1998), 'Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease', *Cell*, 93 (6), 973-83.
- Charrow, J. (2004), 'Ashkenazi Jewish genetic disorders', *Familial cancer*, 3 (3-4), 201-6.
- Chen, D. H., et al. (2003), 'Missense mutations in the regulatory domain of PKC gamma: a new mechanism for dominant nonepisodic cerebellar ataxia', *Am J Hum Genet*, 72 (4), 839-49.
- Crosby, A. H., et al. (2010), 'Defective mitochondrial mRNA maturation is associated with spastic ataxia', *American journal of human genetics*, 87 (5), 655-60.
- Date, H., et al. (2001), 'Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene', *Nat Genet*, 29 (2), 184-8.
- Di Bella, D., et al. (2010), 'Mutations in the mitochondrial protease gene AFG3L2 cause dominant hereditary ataxia SCA28', *Nat Genet*, 42 (4), 313-21.
- Dion, P. A., Daoud, H., and Rouleau, G. A. (2009), 'Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms', *Nat Rev Genet*, 10 (11), 769-82.
- Dumitrescu, A. M., et al. (2004), 'A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene', *Am J Hum Genet*, 74 (1), 168-75.
- Durr, A. (2010), 'Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond', *Lancet Neurol*, 9 (9), 885-94.

- Durr, A., Tallaksen, C., and Depienne, C. (1993), 'Spastic Paraplegia Type 4', in R. A. Pagon, et al. (eds.), *GeneReviews* (Seattle (WA)).
- Edvardson, S., et al. (2008), 'Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia', *Am J Hum Genet*, 83 (5), 643-8.
- Edwards, T. L., et al. (2009), 'Endogenous spartin (SPG20) is recruited to endosomes and lipid droplets and interacts with the ubiquitin E3 ligases AIP4 and AIP5', *Biochem J*, 423 (1), 31-9.
- Elferink, L. A., Trimble, W. S., and Scheller, R. H. (1989), 'Two vesicle-associated membrane protein genes are differentially expressed in the rat central nervous system', *J Biol Chem*, 264 (19), 11061-4.
- Elleuch, N., et al. (2006), 'Mutation analysis of the paraplegin gene (SPG7) in patients with hereditary spastic paraplegia', *Neurology*, 66 (5), 654-9.
- Engert, J. C., et al. (1999), 'Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS): high-resolution physical and transcript map of the candidate region in chromosome region 13q11', *Genomics*, 62 (2), 156-64.
- Engert, J. C., et al. (2000), 'ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF', *Nature genetics*, 24 (2), 120-5.
- Erichsen, A. K., et al. (2009), 'Prevalence of hereditary ataxia and spastic paraplegia in southeast Norway: a population-based study', *Brain : a journal of neurology*, 132 (Pt 6), 1577-88.

- Escayg, A., et al. (2000), 'Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia', *Am J Hum Genet*, 66 (5), 1531-9.
- Fink, J. K. (1993), 'Hereditary Spastic Paraplegia Overview', in R. A. Pagon, et al. (eds.), *GeneReviews* (Seattle (WA)).
- Fiskerstrand, T., et al. (2010), 'Mutations in ABHD12 cause the neurodegenerative disease PHARC: An inborn error of endocannabinoid metabolism', *Am J Hum Genet*, 87 (3), 410-7.
- Friedland, D. R., Eernisse, R., and Popper, P. (2008), 'Identification of a novel Vamp1 splice variant in the cochlear nucleus', *Hear Res*, 243 (1-2), 105-12.
- Fuerst, J. C., et al. (2011), 'Distinct intracellular vesicle transport mechanisms are selectively modified by spastin and spastin mutations', *J Cell Physiol*, 226 (2), 362-8.
- Fujigasaki, H., et al. (2001), 'SCA12 is a rare locus for autosomal dominant cerebellar ataxia: a study of an Indian family', *Ann Neurol*, 49 (1), 117-21.
- Geschwind, D. H., et al. (1997a), 'The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia', *Am J Hum Genet*, 60 (4), 842-50.
- Geschwind, D. H., et al. (1997b), 'Spinocerebellar ataxia type 6. Frequency of the mutation and genotype-phenotype correlations', *Neurology*, 49 (5), 1247-51.

- Ghez, C and Thach, W. T. (2000), 'Chapter 42: The Cerebellum', in E. R. Kandel, J. H. Schwartz, and T. M. Jessell (eds.), *Principles of Neural Science* (4 edn.; United States of America: McGraw-Hill).
- Gilerovich, E. G., et al. (2008), 'Morphofunctional characteristics of the lumbar enlargement of the spinal cord in rats', *Neurosci Behav Physiol*, 38 (8), 855-60.
- Goizet, C., et al. (2009), 'SPG15 is the second most common cause of hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum', *Neurology*, 73 (14), 1111-9.
- Goshgarian, H. G. (2003), 'Neuroanatomic Organization of the Spinal Gray and White Matter', in V. W. Lin, et al. (eds.), *Spinal Cord Medicine: Principles and Practice* (New York: Demos Medical Publishing).
- (2010), 'Neuroanatomic Organization of the Spinal Gray and White Matter', in V. W. Lin, et al. (eds.), *Spinal Cord Medicine: Principles and Practice* (2 edn.; New York: Demos Medical Publishing).
- Green, R. C., et al. (2007), 'Very high incidence of familial colorectal cancer in Newfoundland: a comparison with Ontario and 13 other population-based studies', *Familial cancer*, 6 (1), 53-62.
- Grewal, K. K., et al. (2004), 'A founder effect in three large Newfoundland families with a novel clinically variable spastic ataxia and supranuclear gaze palsy', *Am J Med Genet A*, 131 (3), 249-54.
- Gros-Louis, F., et al. (2007), 'Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia', *Nat Genet*, 39 (1), 80-5.

- Hanein, S., et al. (2008), 'Identification of the SPG15 gene, encoding spastizin, as a frequent cause of complicated autosomal-recessive spastic paraplegia, including Kjellin syndrome', *Am J Hum Genet*, 82 (4), 992-1002.
- Hansen, J. J., et al. (2002), 'Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60', *Am J Hum Genet*, 70 (5), 1328-32.
- Hazan, J., et al. (1999), 'Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia', *Nat Genet*, 23 (3), 296-303.
- Hedera, P. (2009), 'Hereditary spastic paraplegia or spinocerebellar ataxia? Not always as easy as it seems', *Eur J Neurol*, 16 (8), 887-8.
- Hirayama, K., et al. (1994), 'Spinocerebellar degenerations in Japan: a nationwide epidemiological and clinical study', *Acta Neurol Scand Suppl*, 153, 1-22.
- Holmes, S. E., et al. (1999), 'Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12', *Nat Genet*, 23 (4), 391-2.
- Houlden, H., et al. (2007), 'Mutations in TTBK2, encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11', *Nat Genet*, 39 (12), 1434-6.
- Ikeda, Y., et al. (2006), 'Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5', *Nat Genet*, 38 (2), 184-90.
- Isenmann, S., et al. (1998), 'A splice-isoform of vesicle-associated membrane protein-1 (VAMP-1) contains a mitochondrial targeting signal', *Mol Biol Cell*, 9 (7), 1649-60.

- Ishikawa, K., et al. (2005), 'An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single-nucleotide substitution in the 5' untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and Rho guanine-nucleotide exchange-factor domains', *Am J Hum Genet*, 77 (2), 280-96.
- Jansen, G. A., et al. (1997), 'Phytanoyl-coenzyme A hydroxylase deficiency -- the enzyme defect in Refsum's disease', *N Engl J Med*, 337 (2), 133-4.
- Jen, J. C., et al. (2005), 'Mutation in the glutamate transporter EAAT1 causes episodic ataxia, hemiplegia, and seizures', *Neurology*, 65 (4), 529-34.
- Jen, J. C., et al. (2007), 'Primary episodic ataxias: diagnosis, pathogenesis and treatment', *Brain : a journal of neurology*, 130 (Pt 10), 2484-93.
- Jodice, C., et al. (1997), 'Episodic ataxia type 2 (EA2) and spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) due to CAG repeat expansion in the CACNA1A gene on chromosome 19p', *Human molecular genetics*, 6 (11), 1973-8.
- Jouet, M., et al. (1994), 'X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene', *Nat Genet*, 7 (3), 402-7.
- Kawaguchi, Y., et al. (1994), 'CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1', *Nat Genet*, 8 (3), 221-8.
- Kim, P. K., et al. (1999), 'Identification of the endoplasmic reticulum targeting signal in vesicle-associated membrane proteins', *J Biol Chem*, 274 (52), 36876-82.
- Klebe, S., et al. (2005), 'New mutations in protein kinase Cgamma associated with spinocerebellar ataxia type 14', *Ann Neurol*, 58 (5), 720-9.
- Klockgether, T. (2011), 'Update on degenerative ataxias', *Curr Opin Neurol*, 24 (4), 339-45.

- Knight, M. A., et al. (2008), 'A duplication at chromosome 11q12.2-11q12.3 is associated with spinocerebellar ataxia type 20', *Human molecular genetics*, 17 (24), 3847-53.
- Kobayashi, H., et al. (2011), 'Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement', *Am J Hum Genet*, 89 (1), 121-30.
- Koide, R., et al. (1999), 'A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease?', *Human molecular genetics*, 8 (11), 2047-53.
- Koide, R., et al. (1994), 'Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA)', *Nat Genet*, 6 (1), 9-13.
- Koob, M. D., et al. (1999), 'An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8)', *Nat Genet*, 21 (4), 379-84.
- Lander, E. S., et al. (2001), 'Initial sequencing and analysis of the human genome', *Nature*, 409 (6822), 860-921.
- Le Ber, I., et al. (2004), 'Frequency and phenotypic spectrum of ataxia with oculomotor apraxia 2: a clinical and genetic study in 18 patients', *Brain : a journal of neurology*, 127 (Pt 4), 759-67.
- Lee, W. W., et al. (2009), 'Extrapyramidal signs are a common feature of spinocerebellar ataxia type 17', *Neurology*, 73 (20), 1708-9.
- Lin, P., et al. (2008), 'A missense mutation in SLC33A1, which encodes the acetyl-CoA transporter, causes autosomal-dominant spastic paraplegia (SPG42)', *Am J Hum Genet*, 83 (6), 752-9.

- Liu, T., et al. (2011a), 'Calcium triggers exocytosis from two types of organelles in a single astrocyte', *J Neurosci*, 31 (29), 10593-601.
- Liu, Y., Sugiura, Y., and Lin, W. (2011b), 'The role of Synaptobrevin1/VAMP1 in Ca²⁺-triggered neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction', *J Physiol*, 589 (Pt 7), 1603-18.
- Mandic, R., Trimble, W. S., and Lowe, A. W. (1997), 'Tissue-specific alternative RNA splicing of rat vesicle-associated membrane protein-1 (VAMP-1)', *Gene*, 199 (1-2), 173-9.
- Mannan, A. U., et al. (2006), 'ZFYVE27 (SPG33), a novel spastin-binding protein, is mutated in hereditary spastic paraplegia', *Am J Hum Genet*, 79 (2), 351-7.
- Matsuura, T., et al. (2000), 'Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10', *Nat Genet*, 26 (2), 191-4.
- McMahon, H. T., et al. (1993), 'Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein', *Nature*, 364 (6435), 346-9.
- McMonagle, P., Webb, S., and Hutchinson, M. (2002), 'The prevalence of "pure" autosomal dominant hereditary spastic paraparesis in the island of Ireland', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 72 (1), 43-6.
- Meijer, I. A., et al. (2002), 'A locus for autosomal dominant hereditary spastic ataxia, SAX1, maps to chromosome 12p13', *Am J Hum Genet*, 70 (3), 763-9.
- Mihalik, S. J., et al. (1997), 'Identification of PAHX, a Refsum disease gene', *Nat Genet*, 17 (2), 185-9.

- Mollet, J., et al. (2007), 'Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders', *J Clin Invest*, 117 (3), 765-72.
- Moreira, M. C., et al. (2004), 'Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2', *Nat Genet*, 36 (3), 225-7.
- Ng, P. C. and Henikoff, S. (2001), 'Predicting deleterious amino acid substitutions', *Genome Research*, 11 (5), 863-74.
- Nikali, K., et al. (2005), 'Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins Twinkle and Twinky', *Human molecular genetics*, 14 (20), 2981-90.
- Nystuen, A. M., et al. (2007), 'A null mutation in VAMP1/synaptobrevin is associated with neurological defects and prewean mortality in the lethal-wasting mouse mutant', *Neurogenetics*, 8 (1), 1-10.
- Orthmann-Murphy, J. L., et al. (2009), 'Hereditary spastic paraplegia is a novel phenotype for GJA12/GJC2 mutations', *Brain : a journal of neurology*, 132 (Pt 2), 426-38.
- Ouahchi, K., et al. (1995), 'Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein', *Nat Genet*, 9 (2), 141-5.
- Palau, F. and Espinos, C. (2006), 'Autosomal recessive cerebellar ataxias', *Orphanet J Rare Dis*, 1, 47.
- Parfitt, D. A., et al. (2009), 'The ataxia protein sacs1 is a functional co-chaperone that protects against polyglutamine-expanded ataxin-1', *Human molecular genetics*, 18 (9), 1556-65.

- Patel, H., et al. (2002), 'SPG20 is mutated in Troyer syndrome, an hereditary spastic paraplegia', *Nat Genet*, 31 (4), 347-8.
- Pope, A. M., et al. (2011), 'Mitogenomic and microsatellite variation in descendants of the founder population of Newfoundland: high genetic diversity in an historically isolated population', *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada*, 54 (2), 110-9.
- Pulst, S. M., et al. (1996), 'Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2', *Nat Genet*, 14 (3), 269-76.
- Purves, D. (2001), 'Table 1.1 The Cranial Nerves and Their Primary Functions', in D. Purves, et al. (eds.), *Neuroscience* (2 edn.; Sunderland: Sinauer Associates, Inc).
- Quinzii, C. M., et al. (2005), 'Coenzyme Q deficiency and cerebellar ataxia associated with an aprataxin mutation', *Neurology*, 64 (3), 539-41.
- Rahman, P., et al. (2003), 'The Newfoundland population: a unique resource for genetic investigation of complex diseases', *Human molecular genetics*, 12 Spec No 2, R167-72.
- Rainier, S., et al. (2003), 'NIPA1 gene mutations cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG6)', *Am J Hum Genet*, 73 (4), 967-71.
- Rainier, S., et al. (2008), 'Neuropathy target esterase gene mutations cause motor neuron disease', *Am J Hum Genet*, 82 (3), 780-5.
- Ramakrishnan, N. A., Drescher, M. J., and Drescher, D. G. (2012), 'The SNARE complex in neuronal and sensory cells', *Mol Cell Neurosci*.

- Ramensky, V., Bork, P., and Sunyaev, S. (2002), 'Human non-synonymous SNPs: server and survey', *Nucleic acids research*, 30 (17), 3894-900.
- Reese, M. G., et al. (1997), 'Improved splice site detection in Genie', *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*, 4 (3), 311-23.
- Reid, E., et al. (2002), 'A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10)', *Am J Hum Genet*, 71 (5), 1189-94.
- Richter, A., et al. (1999), 'Location score and haplotype analyses of the locus for autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay, in chromosome region 13q11', *American journal of human genetics*, 64 (3), 768-75.
- Rossetto, O., et al. (1996), 'VAMP/synaptobrevin isoforms 1 and 2 are widely and differentially expressed in nonneuronal tissues', *J Cell Biol*, 132 (1-2), 167-79.
- Rosulescu, E., et al. (2009), 'Hereditary spastic paraplegia', *Rom J Morphol Embryol*, 50 (2), 299-303.
- Saugier-Veber, P., et al. (1994), 'X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus', *Nat Genet*, 6 (3), 257-62.
- Savitsky, K., et al. (1995), 'A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase', *Science*, 268 (5218), 1749-53.
- Shoukier, M., et al. (2009), 'Expansion of mutation spectrum, determination of mutation cluster regions and predictive structural classification of SPAST mutations in

- hereditary spastic paraplegia', *European journal of human genetics : EJHG*, 17 (2), 187-94.
- Shoulders, C. C., et al. (1993), 'Abetalipoproteinemia is caused by defects of the gene encoding the 97 kDa subunit of a microsomal triglyceride transfer protein', *Human molecular genetics*, 2 (12), 2109-16.
- Simpson, M. A., et al. (2003), 'Maspardin is mutated in mast syndrome, a complicated form of hereditary spastic paraplegia associated with dementia', *Am J Hum Genet*, 73 (5), 1147-56.
- Slabicki, M., et al. (2010), 'A genome-scale DNA repair RNAi screen identifies SPG48 as a novel gene associated with hereditary spastic paraplegia', *PLoS Biol*, 8 (6), e1000408.
- Soderblom, C., et al. (2010), 'Targeted disruption of the Mast syndrome gene SPG21 in mice impairs hind limb function and alters axon branching in cultured cortical neurons', *Neurogenetics*, 11 (4), 369-78.
- Statistique-Canada (2011), 'Estimations démographiques trimestrielles: Avril à juin 2011', (25; Ottawa), 16.
- Steggmaier, M., et al. (1999), 'Vesicle-associated membrane protein 4 is implicated in trans-Golgi network vesicle trafficking', *Mol Biol Cell*, 10 (6), 1957-72.
- Stevanin, G., et al. (2007), 'Mutations in SPG11, encoding spatacin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum', *Nat Genet*, 39 (3), 366-72.

- Stewart, G. S., et al. (1999), 'The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder', *Cell*, 99 (6), 577-87.
- Storey, E., et al. (2000), 'Frequency of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Australian patients with spinocerebellar ataxia', *Am J Med Genet*, 95 (4), 351-7.
- Sudhof, T. C. (1995), 'The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions', *Nature*, 375 (6533), 645-53.
- Sudhof, T. C. (2008), 'Neurotransmitter release', *Handb Exp Pharmacol*, (184), 1-21.
- Synofzik, M., et al. (2011), 'Spinocerebellar ataxia type 15: diagnostic assessment, frequency, and phenotypic features', *J Med Genet*, 48 (6), 407-12.
- Takashima, H., et al. (2002), 'Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy', *Nat Genet*, 32 (2), 267-72.
- Tallaksen, C. M., Durr, A., and Brice, A. (2001), 'Recent advances in hereditary spastic paraplegia', *Curr Opin Neurol*, 14 (4), 457-63.
- Teive, H. A. (2009), 'Spinocerebellar ataxias', *Arq Neuropsiquiatr*, 67 (4), 1133-42.
- Thiffault, I., et al. (2006), 'A new autosomal recessive spastic ataxia associated with frequent white matter changes maps to 2q33-34', *Brain : a journal of neurology*, 129 (Pt 9), 2332-40.
- Thomas, P. D., et al. (2006), 'Applications for protein sequence-function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools', *Nucleic acids research*, 34 (Web Server issue), W645-50.

- Tomecki, R., et al. (2004), 'Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase', *Nucleic acids research*, 32 (20), 6001-14.
- Trimble, W. S., Cowan, D. M., and Scheller, R. H. (1988), 'VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (12), 4538-42.
- Trimble, W. S., et al. (1990), 'Distinct patterns of expression of two VAMP genes within the rat brain', *J Neurosci*, 10 (4), 1380-7.
- Trottier, Y., et al. (1995), 'Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias', *Nature*, 378 (6555), 403-6.
- Tsaousidou, M. K., et al. (2008), 'Sequence alterations within CYP7B1 implicate defective cholesterol homeostasis in motor-neuron degeneration', *Am J Hum Genet*, 82 (2), 510-5.
- Valdmanis, P. N., et al. (2007), 'Mutations in the KIAA0196 gene at the SPG8 locus cause hereditary spastic paraplegia', *Am J Hum Genet*, 80 (1), 152-61.
- van de Leemput, J., et al. (2007), 'Deletion at ITPR1 underlies ataxia in mice and spinocerebellar ataxia 15 in humans', *PLoS Genet*, 3 (6), e108.
- Van Goethem, G., et al. (2004), 'POLG mutations in neurodegenerative disorders with ataxia but no muscle involvement', *Neurology*, 63 (7), 1251-7.
- van Swieten, J. C., et al. (2003), 'A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebellar ataxia [corrected]', *Am J Hum Genet*, 72 (1), 191-9.

- Venter, J. C., et al. (2001), 'The sequence of the human genome', *Science*, 291 (5507), 1304-51.
- Vermeer, S., et al. (2010), 'Targeted next-generation sequencing of a 12.5 Mb homozygous region reveals ANO10 mutations in patients with autosomal-recessive cerebellar ataxia', *Am J Hum Genet*, 87 (6), 813-9.
- Waters, M. F., et al. (2006), 'Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes', *Nat Genet*, 38 (4), 447-51.
- Windpassinger, C., et al. (2004), 'Heterozygous missense mutations in BSCL2 are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome', *Nat Genet*, 36 (3), 271-6.
- Wong, S. H., et al. (1998), 'Endobrevin, a novel synaptobrevin/VAMP-like protein preferentially associated with the early endosome', *Mol Biol Cell*, 9 (6), 1549-63.
- Yamasaki, S., et al. (1994), 'Cleavage of members of the synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulinal neurotoxins and tetanus toxin', *J Biol Chem*, 269 (17), 12764-72.
- Zeng, Q., et al. (1998), 'A novel synaptobrevin/VAMP homologous protein (VAMP5) is increased during in vitro myogenesis and present in the plasma membrane', *Mol Biol Cell*, 9 (9), 2423-37.
- Zhang, J. C., Sun, L., and Nie, Q. H. (2010), 'Botulism, where are we now?', *Clin Toxicol (Phila)*, 48 (9), 867-79.

- Zhao, X., et al. (2001), 'Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia', *Nat Genet*, 29 (3), 326-31.
- Zhuchenko, O., et al. (1997), 'Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel', *Nat Genet*, 15 (1), 62-9.
- Zuchner, S., et al. (2006), 'Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31', *Am J Hum Genet*, 79 (2), 365-9.